Archiv für Protistenkunde







Archiv

für

Protistenkunde

begründet von

Dr. Fritz Schaudinn,

herausgegeben

von

Dr. M. Hartmann Berlin. und **Dr. S. von Prowazek** Hamburg.

Dreizehnter Band.

Mit 28 Tafeln und 40 Textfiguren.



JENA.
Verlag von Gustav Fischer.
1909.

Inhaltsübersicht.

Erstes Heft.

Zweites Heft.

Drittes Heft.

Herpetomonas lygaei.

By
Captain **W. S. Patton**, M. B., Edin., I. M. S.
King Institute of Preventive Medicine, Madras.

(With Plate I and 2 Textfigures.)

In an earlier paper (1) I drew attention to the close resemblance between a species of *Herpetomonas* and the Leishman-Donovan body. Although throughout its life cycle this *Herpetomonas* is much larger than the corresponding stages of the Leishman-Donovan body, its striking similarity to that parasite can leave no doubt that the study of these insect flagellates will not only decide the exact biological position of the human parasite, but will also throw important light on the, as yet unknown, stages in its development. Since writing the above paper I have been fortunate enough to discover another *Herpetomonas* in the intestinal tract of the Lygaeid bug, *Lygaeus militaris* Fabr., which as will be seen later is almost identical with the Leishman-Donovan body and in the present paper I propose describing in detail its structure and life cycle.

Material and methods.

Lygaeus militaris, the type species of the genus, is pale sanguineous in colour, its pronotum has a black central anterior margin to which are connected two long arcuated fasciae reaching to the posterior margins near the lateral angles. There is a small black spot near the apex of the clavus and a transverse black

fascia on the corium. The wing membranes are pale brownish ochraceous with a spot at the base and two spots sometimes coalescing abont the middle line.

Mr. Distant (2) gives the distribution of this bug in India as follows: Pnnjab, Hardwar, Bangalore and Mysore. Curiously enough it has not been recorded from Madras where it is very plentiful, and Mr. Maxwell Lefroy, Entomologist to the Government of India, who kindly identified it, informs me it is one of the commonest bugs in India. It is also found in Burma, Malay Archipelago, Australia, Sonth Africa and the Sondan where it is known as the Dura plant bug. In Madras it is almost exclusively fonnd on *Calotropis gigantea*, feeding on the juice of its pods, young leaves and seeds: it is interesting to note that the distribution of this plant as given by Hocker (3) corresponds almost exactly with that of the bng. *Lygaeus militaris* is found in Madras throughout the year but is very abundant from April to September; the adult female lays its eggs, usually thirty-four in number, at the root of the plant and in six days the nymphs hatch out. They shed their skins five times and after about five weeks arrive at maturity.

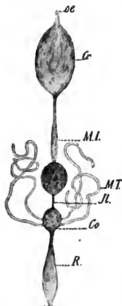


Fig. A.
Alimentary canal of *Lygæus militaris* Fabr.
Oe = Ösophagus; Cr = Crop; MI = Mid-intestine; MT = Malpighian tubes; Jl = Ileum; Co = Colon; R = Rectum.

The alimentary tract of this bug (Fig. A) consists of a short narrow oesophagus (*Oe*) opening into a large sacculated crop (*Cr*), which when distended with the white juice of *Calotropis gigantea* bulges well into the lower segments of the abdomen. The crop opens into the long mid-intestine (*MI*), which is narrow at first but gradually becomes wider ending abruptly in a large dilatation, which always contains a yellow fluid; this dilated portion probably corresponds to the pyloric ampnlla of other insects. Dr. Sharp (4) rightly states, "that in the Rhynchota it is difficult to assign any of the parts posterior to the crop to the divisions nsual in other insects and it is said the distinction of parts histologically is as vague as it is anatomically". The small intestine consists of a short narrow ilenm (*Jl*)

which opens into the dilated colon (*Co*), into which four long malpighian tubes (*MT*) are inserted. *Lygaeus* is oneof the insect forms in which the nrinary tubes, instead of opening into the jnnction of the mid-and hind-intestine open into the large intestine. The colon is continuous with the short straight rectnm which ends externally at the anus.

On examining in the fresh condition the contents of the crop of a specimen of *Lygaeus militaris* I found it to be swarming with a flagellate which on staining with Giemsa's stain I recognised as a species of *Herpetomonas.* In all the specimens subsequently axamined in addition to the flagellates in the crop many were seen massed in bundles in the colon, and below the openings of the malpighian tubes innumerable flagellates were attached by their flagellar ends to the intestinal epithelium, their posterior poles lashing from side to side; still further down the epithelium was covered with small ronnd and oval bodies (Fig. B) which, though smaller, are similar to bodies I have seen in the rectums of flies (*Musca domestica* and *Sarcophaga sp.?*) infected with *Herpetomonas muscae domesticae* and *Herpetomonas sarcophagae?* respectively.

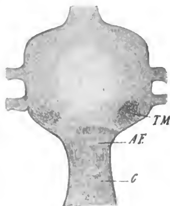


Fig. B.
Colon and rectum of *Lygæus militaris* showing parasites as seen in the fresh condition (somewhat diagrammatic).
TM = Tanghed masses of flagellates;
AF = Attached flagellates;
C = Cysts.

These forms represent the encysted stages of the flagellates. Prowazek (5) in his description of *Herpetomonas muscae domesticae* describes the formation of the cyst of this flagellate, he however does not mention the occnrrence of the cysts in masses in the rectum of the fly. In all the species of *Herpetomonas* I have had the opportnnity of stndying, the encysted stages were readily found in the rectnms of their insect hosts.

From the above observations it was clear that the flagellates of *Lygaeus militaris* after remaining for an indefinite period in the npper part of the alimentary canal pass down and collect in the large intestine where they finally encyst. The cysts as well as nnmerous living flagellates are passed

ont in the fluid faeces and the former are readily fonnd in stained smears of dried faeces.

A large number of adult bugs were collected and placed in glass jars with the leaves and pods of *Calotropis gigantea*; when a number of eggs were laid they were transferred to a clean bottle in order later to study the method of infection. The adult specimens, male and female, were examined at regular intervals and it was found that they were all infected, some more than others, and in the large intestines of the majority parasites exhibiting all the various stages of encystment were abundant. A number of young nymphs were placed in the jars with the adults while many more were kept quite separate; it was thus possible to settle the exact method of infection.

On dissecting out the digestive tract, the crop was isolated and placed in a small drop of saline solution on a clean slide; its contents were then expressed with two needles and the fluid on being well mixed was made into a thin film with a bit of slide. It was rapidly dried, fixed in absolute alcohol and stained either with Romanowsky's or Giemsa's stain. The contents of the colon with the free flagellates were similarly made into a thin film. That part of the large intestine containing the attached flagellates and cysts on being isolated was teased into smaller pieces and each was smeared out with the edge of a slide and stained as above. The fluid faeces was drawn into a fine pipette, blown on to a clean slide and made into thin films, the dry faeces was scraped of the pods and leaves, mixed with a little normal saline solution and lightly smeared out. These methods were fonnd to give the best results.

Structure and life cycle of the parasite.

The discovery of the encysted stage of the parasite in the faeces of the bug led to a search being made for the cysts in the crop contents, and after examining a number of stained preparations I found this stage in large numbers in about half the films. My previous studies of the life cycles of several species of *Herpetomonas* and *Crithidia* and more especially of the development of the Leishman-Donovan body in *Cimex rotundatus* Sign. have been of great help in working out the life cycle of this *Herpetomonas*. As in all the above parasites the life cycle invariably begins with the ingestion of the non-flagellate stage by its host, I will begin my description of the parasite from this point.

The cysts are always free in the crop contents and are exactly similar to those found iu the faeces. They are either oval, round or pear shaped bodies (Plate I Fig. 1) measuring from 3,5 μ to 4 μ in length and from 2 μ to 2,5 μ in breadth. Their protoplasm stains a delicate blne with Romanowsky's stain and light pink with Giemsa's and when highly magnified is seen to consist of a delicate reticnlum which in parts is finely vacuolated. The parasites are clearly outlined by a coudensed layer of protoplasm, the periplast, which stains deep blue with Romanowsky's staiu bnt pink with Giemsa's. The uuclens, nearly always at the rounder end of the parasite, is a compact mass staining deep pink and measnring about 1 μ iu diameter; it may be circular or more commonly kidney-shaped with the concavity directed towards the centre of the cell. When highly magnified it is seen to contain four chromosomes, this number however is not always constant as very ofteu only two can be distiuctly seen; many of the nnclei show a central pale area, while the margin stains much darker probably owing to the chromosomes occnpying the periphery. In specimens deeply stained by Giemsa's stain and subsequently decolorised the recticnlated nnclens appears to be surrounded by a distinct membrane (Plate I Fig. 1). The blepharoplast, about one third the size of the nuclens, is almost always circular in shape and stains deep magenta with Romanowsky's and Giemsa's stains. It is as a rule sitnated about the centre of the parasite but may be displaced to either side. Owing to its small size and great avidity for the staiu it is not possible in ordinary specimens to demonstrate any inner strncture bnt in rnptured cells it is seeu to contain (under a magnification of 2700 diameters) a small chromatic dot; in some specimens it had the appearance of a small ring. There was no other structnre visible in the cysts.

A general enlargement of a cyst is the first stage towards development; it increases in length and breadth, its protoplasm retaining its original staiuing characters there being no increased vacuolation. At the same time the nnclens enlarges, its network becomes looser and stains less deeply while the chromosomes increasing in number pass to each side. It now has a bilobed appearance, its central portion staining lightly indicating the line of cleavage and when division is completed the danghter nuclei separate and pass to the sides (Plate I Fig. 2). Iu such a cell the blepharoplast appears thickened and elongated later, however, the ends become rounded and it looks like a diplococcus. On the division and separatiou of the nnclei and blepharoplasts the posterior end of the

parasite becomes indented and a pale area begins to develop down the centre and the parasite finally splits longitudinally into two. In the majority of these pairs the posterior or nuclear ends pass in opposite directions so that the anterior ends remain in close opposition (Plate I Fig. 3). There appears to be a slight variation in this method of division, the two nuclei on separating sometimes pass to the opposite ends of the cell, the blepharoplasts remaining just beyond the centre of the parasite and division now takes place through a shorter diameter. Each parasite immediately begins to divide again in exactly the same manner as described above (Plate I Fig. 3) and the resulting four bodies remain attached by their anterior ends (Plate I Fig. 4). This appearance is very characteristic of the parasite and is the commonest method of development; a small percentage of parasites however instead of dividing again develop into flagellates. I will first describe the changes undergone by the groups of four parasites.

On examining a stained preparation of the crop contents of a bng, which contains many of these forms, in nearly every group one or more of the parasites has already flagellated, the remainder showing varying gradations in size; some without developing further have divided again while others have commenced to elongate preparatory to division and flagellation. These gronps of flagellated and non-flagellated forms are firmly connected together by their anterior ends, and in the fresh condition the whole group is drawn along by the flagellate (Plate I Fig. 9 and 10). Althongh I have had the opportunity of studying at least a dozen species of *Herpetomonas*, this is the only one I have seen that exhibits this curions method of mnltiplication. On stndying groups of four parasites many of them will be seen to have simnltaneously increased in size (Plate I Fig. 5) their anterior ends become elongated and pointed while the posterior ends are still rounded, their nuclei are considerably enlarged, stain a lighter pink and contain from eight to ten circular chromosomes; the blepharoplasts are also enlarged and are almost round. The protoplasm of these cells stains a deeper blne with Romanowsky's stain, is more vesicular in structure and in parts has a fine granular appearance. Each parasite is distinctly ontlined by a periplast. In still older specimens the posterior ends lose the rounded shape and become more and more elongated and as growth proceeds the cells become spindle-shaped (Plate I Fig. 6); their nuclei and blepharoplasts now occupy a central position lying as a rule close to each other. On staining the cells deeply

with Giemsa's stain the protoplasm of the posterior ends appears markedly vesicular, stains deep blue and contains small pink staining strands (Plate I Fig. 6); the anterior ends stain uniformally pink and often contain a pale area near the blepharoplast. If a number of these deeply stained spindle-shaped cells are examined under a high magnification, in one or more a small pink rod is seen lying in the pale area between the blepharoplast and the anterior end of the parasite (Plate I Fig. 6), in older specimens it is seen as a short straight pink filament arising from a point close to the blepharoplast but in no way connected directly with it (Plate I Fig. 6). This pink staining filament is the flagellum and in its earliest stage it is always seen to arise from an achromatic area in close proximity to the blepharoplast. In still later specimens it extends towards the anterior end of the parasite finally projecting free of it almost exactly at its centre and once free grows into a long wavy flagellnm (Plate I Fig. 6 and 10). It is important to note that the flagellum under a high magnification consists of a single thick filament and not of a number bound together. As the parasites arrive at maturity the blepharoplasts pass down towards the anterior ends and the individuals of the group soon separate and swim away.

In those gronps in which the parasites have not all developed at the same time one may have become an adult flagellate and attached around its anterior ends are the yonnger parasites in varions stages of development (Plate I Fig. 9). Frequently one or more of the young cells is unchanged while the remainder have enlarged, become spindle-shaped and divided preparatory to flagellation, or as is more commonly the case one of the original cells has divided, half becoming an adult flagellate, another has divided again and the third has become spindle-shaped and divided while the fourth remains unchanged (Plate I Fig. 9). In this way a group consisting of five, seven or nine cells in varying stages of development is formed. As the remaining cells develop and flagellate the groups break up and if watched for some time in the fresh condition the adult flagellates can be seen freeing themselves and swimming away. In the films of crop contents there are always some pairs of spindle-shaped cells attached by their anterior ends, these parasites can be traced back to cysts which have only divided once; they are exactly similar to the spindle-shaped cells described above (Plate I Fig. 6).

A typical adult flagellate (Plate I Fig. 11) measures from 20 μ to 25 μ in length and from 4 μ to 5 μ in breadth, its posterior

end is markedly pointed, its body cylindrical and its anterior end blunt. Its protoplasm which stains dark blue is vesicular in structure, the posterior portion containing a number of pink staining granules; the anterior end stains more pink than blue and usually contains one unstained area between the nucleus and the blepharoplast and another between the blepharoplast and the anterior end. The whole parasite is outlined by a delicate periplast which is best seen when deeply stained by Giemsa's stain. The nucleus circular in shape lies almost at its centre, it stains light pink and is surrounded by a well marked membrane; its chromosomes, from eight to twelve in number are arranged radially along its margin, some are more conspicuous than others and appear as short rods. I have not been able to satisfy myself that the nucleus has a karyosome, as in some specimens its central portion is clear, while in others it is occupied by what looks like a chromosome. The blepharoplast, more rod shaped than round, stains almost black and measures about 1,5 μ in length, it is always situated about 4 μ from the anterior end and in many parasites has a double appearance suggesting commencing division. The flagellum, about 40 μ in length consists of a single stout filament which arises from the achromatic space just anterior to the blepharoplast and passes out of the anterior end. The intracellular portion does not differ in structure from the remainder and it has no basal granule in connection with it.

On examining a flagellate which is about to divide longitudinally the nucleus appears much enlarged, stains less deeply and is full of large circular chromosomes (Plate I Fig. 12); the blepharoplast is also thickened and elongated. In suitable specimens a small pink filament is seen lying in the achromatic space close to the root of the flagellum from which it is entirely separate; this structure represents the early development of the second flagellum and appears to be formed in the same way as the original one. In parasites more advanced towards division it is seen growing out towards the anterior end and on becoming free is intimately associated with the first flagellum. In a still further stage the blepharoplast splits transversely and the two halves separate; at the same time the nucleus elongates and divides as described above and on a clear line forming between the roots of the flagella the anterior ends of the parasites separate first and later division extends to the posterior ends (Plate I Fig. 13). It is quite common in stained preparations to observe all the stages of longitudinal division from the formation of the second flagellum up to the complete separation of the two

parasites. I have never observed any of these flagellates dividing unequally, nor do they appear to divide more than once as the majority are all about the same size and extremely thin forms were never seen.

It will be remembered as I pointed out the flagellates collect in large numbers in the pyloric ampulla and colon and that in the latter situation they are seen coiled up together in tangles; on rupturing in the fresh condition a colon containing these entangled flagellates they will be seen to free themselves and are therefore in no way connected with each other. Still further down the large intestine innumerable parasites are found attached to the intestinal epithelium in rows by their flagellar ends, their posterior poles lashing from side to side suggesting the movements of cilia; between these forms and the cysts are parasites of all sizes which are entirely without flagella. All these cells represent the various changes undergone preparatory to encystment which I will now describe.

On examining a stained preparation of the attached flagellates in addition to the adult forms described above a large number consist of short stout parasites, some with long and others short flagella (Plate I Fig. 17 and 18); their protoplasm stains deep blue with Giemsa's stain, is full of large and small vacuoles, and their posterior ends contain a number of light pink granules. These pink staining dots are best seen in compressed parasites as they are often obscnred by the voluminons protoplasm. I have observed these chromatoid grannles in the encysting stages of several species of *Herpetomonas* and *Crithidia*; in *Herpetomonas muscae domesticae* in particular they are very large. The nuclei of the encysting forms of the flagellate of *Lygaeus militaris* stain light pink and contain a large number of circular chromosomes; their blepharoplasts are also considerably enlarged and lie transversely to the long diameters of the cells about 5 μ from the anterior ends (Plate I Fig. 17). The flagella are often seen arising from a large vacnole close to the blepharoplasts, and in many of the cells they are quite short only measuring 10 μ, the greater portion having broken off (Plate I Fig. 18). The nnclei and blepharoplasts in most of these parasites are seen in all stages of division, the flagella are thickened and are often seen splitting longitudinally. The anterior ends of the parasites become indented and the blepharoplasts and nuclei on dividing separate, the flagellum at the same time splitting into two (Plate I Fig. 19). The cells divide further, the line of separation passing through the groups of granules at the posterior ends, some

of which remain in each cell, and two shorter parasites are thus produced. When the flagellates are separating the two flagella may often be seen attached throughout the greater part of their length or by their ends alone in which case they exhibit a shredded appearance (Plate I Fig. 19). At this stage it is not uncommon to find that the flagella have entirely broken off and are only represented by a few strands lying in the anterior ends of the parasites (Plate I Fig. 20). All these appearances indicate that as the flagellum degenerates it is not drawn up into the body of the parasite but the extracellular portion first breaks off and the remainder is absorbed. The parasites resulting from this first division measure from 10 μ to 12 μ in length and from 4,5 μ to 5 μ in breadth; their nuclei are situated about the centre and the blepharoplasts close up to them. These parasites soon begin to divide again, the nuclei and blepharoplasts enlarging and dividing transversely and on the cells splitting two shorter forms 'are produced (Plate I Fig. 20 and 21). These in their turn divide longitudinally (Plate I Fig. 22) and the resulting four bodies are seen lying with their anterior ends in close contact (Plate I Fig. 24). These groups represent the final stages of encystment and are found massed together in the rectum being very loosely attached to the epithelium; they are passed out in the faeces and retain their staining characters even when it has become dry. The cysts in the rectum only differ from those I have described from the crops in that their blepharoplasts are more rod-shaped than circular; in the cysts from the faeces the blepharoplasts are always circular (Plate I Fig. 25). This then concludes the life cycle of the parasite; I am not able at present to say how long it takes to complete its development.

The method of infection.

There is at present considerable confusion regarding the method by which these flagellates are transmitted from one insect to another, so that careful observations on this point are of some importance. Since the researches of the late Dr. Schaudinn (6) on the evolution of *Trypanosoma noctuae* in *Culex pipiens* and those of Prowazek (5) on *Herpetomonas muscae domesticae* in the house fly it is generally believed that these insect flagellates in addition to other methods of transmission actually penetrate the ova of their host and infect the second generation. I have directed special attention to this point in the case of the flagellate of *Lygaeus militaris* and although I

examined a number of infected bugs the flagellates were never found in any other sitnation but the alimentary tract. Twenty female bugs which were snbsequently fonnd to be infected were allowed to ovnlate and the eggs were transferred to a clean bottle; a large nnmber of these eggs were examined by smearing them out on clean slides and staining the films deeply with Giemsa's stain, but in none of the slides could I find any parasites. Some of the eggs were kept for six days and when the nymphs hatched out they were separated and were examined at regular intervals; their alimentary tracts were dissected out, and examined in the fresh condition for flagellates, after which they were smeared out and stained with Giemsa's stain. These nymphs had descended from infected bugs and if the infection were inherited, they should have been themselves infected but I was nnable to find any parasites in their alimentary tracts. On placing some of the remaining nymphs in the bottle in which the adult bngs had previonsly been kept I found that after a fortnight a large percentage contained flagellates in their crops. If the nymphs and the adults of *Lygaeus militaris* are watched it is soon seen that while feeding on the juice of *Calotropis gigantea* they suck up the faeces which others have deposited on the leaves and pods of the plant, and I frequently observed a bug actually inserting its proboscis into fresh fluid faeces. All these observations prove that the infection is contaminative and not hereditary.

The biological position of the parasite.

In 1881 Saville Kent (7) created the genus *Herpetomonas* for the flagellate described by Burnett and others as *Bodo muscae domesticae* from the alimentary tract of *Musca domestica*. Later he provisionally included in this genus the parasite found by Lewis in the blood of rats in India naming it *Herpetomonas Lewisi* and this name was retained by Bütschli and others. Recent work particnlarly that of Laveran and Mesnil (8), has however shown there is a marked divergence in the morphology of the two parasites and has led to Lewis' parasite being placed in the genus *Trypanosoma*, the flagellate of the house fly remaining as the type species of the genus *Herpetomonas*. This genus contains a large number of flagellates, the majority as far as is known insect parasites, which in their adult stages are characterised by the complete absence of an undulating membrane, the single flagellum being attached to the anterior end of the parasite by a short intra-cellular

portion. The blepharoplast is always anterior to the nucleus usually midway between it and the anterior end. The type species *Herpetomonas muscae domesticae* according to Prowazek (5) however has a double flagellum and Lühe (9) restricts this genus to all snch flagellates.

I have had the opportnnity of studying the flagellate of the house fly and am unable to confirm Prowazek's view of its flagellar apparatus; in order to settle this point I carried out a number of feeding experiments in the hot weather of 1907 when flies were abundant in Madras and as a result was able to study the early development of the parasite in the midgut of the fly. Plate I Fig. 14 represents two young forms in one of which the flagellum, a single filament, has just been extruded and is not yet completely uncoiled; in the other parasite it is still seen lying in the 'flagellar vacnole' which is approaching the surface of the cell. Plate I Fig. 15 is a young flagellate of *Herpetomonas muscae domesticae* and it will be seen that it has a single flagellum, division not having begun. The majority of adult flagellates have the appearance of a donble flagellnm as fignred by Prowazek but this can only represent the commencing division of the flagellate. Léger (10) is also of this opinion and figures the adult flagellate of *Herpetomonas muscae domesticae* with a single flagellum. The flagellate of *Lygaeus militaris* is therefore undonbtedly a species of *Herpetomonas* and so far as I am aware differs in many respects from the known species. I therefore propose naming it *Herpetomonas lygaei.*

Comparison of the parasite with that of Kala Azar.

The close similarity between *Herpetomoas lygaei* and the Leishman-Donovan body necessitates a detailed comparison between the structnre and life cycles of the two parasites. As is well known the parasite of Kala Azar occurs in man only in its non-flagellate stage which is one of active multiplication and in no sense a resting stage. It is an oval body (Plate I Fig. 7) measuring from 3,8 μ to 4 μ in its longest diameter and from 2,8 μ to 3 μ in its shortest, its protoplasm stains a delicate blue with Romanowsky's stain and appears to be more condensed towards the sides. When stained deeply with Giemsa's stain its protoplasm stains light pink and the body of the parasite is seen to be outlined by a delicate pink staining periplast. The nucleus is a compact round, oval or kidney shaped mass lying to one side, it stains light pink and when examined

with a high magnification two and sometimes fonr chromosomes are seen lying in its reticnlum. Opposite the nucleus and usually lying at the periphery of the cell is the rod-shaped blepharoplast which stains deep magenta and does not appear to have any inner structnre. Christophers (11) has described a fine filament of a chromatic nature extending from the nucleus to the blepharoplast. Major Donovan, I. M. S., showed me some specimens stained with a modification of Jenner's stain, where this filament was clearly seen; I am unable to offer any explanation as to its nature. The above is the usual appearance of the parasite whether seen in films of splenic or peripheral blood. In man the parasite multiplies either by simple longitndinal fission when the nuclens and blepharoplast elongate and divide or by multiple segmentation (Plate I Fig. 14) as described by Laveran (12), Mesnil (12) and Christophers (11); in this case one of the parasites enlarges the nnclens and blepharoplast dividing a number of times and from fonr to six or more parasites are formed. From the description of the corresponding stages of *Herpetomonas lygaei* it will be seen that it is distinctly smaller than the Leishman-Donovan body and this is especially noticeable in the nuclens and blepharoplast; I have never seen the pink staining filament mentioned above in this parasite. *Herpetomonas lygaei* also divides by simple longitudinal fission, the two resnlting parasites invariably dividing a second time prodncing characteristic groups of four parasites; multiple segmentation of one cell into four or more is never seen in this parasite.

In my (13) researches on the development of the Leishman-Donovan body in *Cimex rotundatus* I have shewn that on the second day the parasite enlarges, its protoplasm becomes vacnolated and the nnclens and blepharoplast begin to shew the earliest changes towards division. At this point one of two changes may take place the parasite may either flagellate or may increase still more in size, the nnclens and blepharoplast dividing a number of times; 'flagellar vacnoles' then develop near the blepharoplasts and later the flagella pass out and the cell divides into from four to eight flagellates. The formation of the flagellum is very characteristic (Plate I Fig. 8), it first appears as a small pink body lying in a vacnole close to the blepharoplast and later on enlarging passes to the periphery of the cell when it is extruded. In the case of *Herpetomonas lygaei* the fonr cells resulting from the second division elongate (Plate I Fig. 5), their nuclei and blepharoplasts at the same time enlarging; when the cells have become spindle-shaped the flagellum develops

in the achromatic area close to the blepharoplast and appears as a fine pink filament. The large, round or oval blue staining flagellates so characteristic of the development of the Leishman-Donovan body are never seen nor is there any true rosette formation. The commonest methods of development of the four parasites are shewn in Plate I Fig. 6, 9 and 10.

The adult flagellate of the Leishman-Donovan body as seen in *Cimex rotundatus* measures from 12 μ to 20 μ in length and from 4 μ to 5 μ in breadth, its posterior end is pointed while the anterior end is rounded; the nucleus lies about the centre of the cell and the blepharoplast about 1,5 μ from the anterior end. The flagellum, a long thin filament, measures from 16 μ to 24 μ and is often seen arising from a chromatic dot just anterior to the blepharoplast. The adult flagellate of *Herpetomonas lygaei* is longer and stouter than that of the Leishman-Donovan body and its blepharoplast usually lies abont 4 μ from its anterior end. The flagellate of the Leishman-Donovan body after remaining five days in the midgut of *Cimex rotundatus* begins to divide irregularly into more than one smaller form, this fact together with the observations on the encysting stages of *Herpetomonas lygaei* suggest that the parasite of Kala Azar again passes back to its non-flagellate stage in the bug most probably in its pharynx when it could readily be introduced into man by the bug when feeding.

Concluding remarks.

Herpetomonas lygaei is a true parasite of *Lygaeus militaris* passing its complete cycle in the alimentary tract of the bug; there is no evidence to shew that the infection is hereditary but all the observations point to the bug ingesting the parasite when obtaining its food. A careful stndy of the flagellates in the fresh and stained preparations before encystment commences has failed to shew any sexual dimorphism, differences in size merely representing forms before and after longitudinal division. The so-called male, female and indifferent cells could not be recognised nor were any of the parasites seen conjugating. From the description of the non-flagellate and flagellate stages of *Herpetomonas lygaei* it will be seen that it is almost identical with the Leishman-Donovan body, I therefore propose adopting the suggestion made by ROGERS (14), that the parasite of Kala Azar belongs to the genus *Herpetomonas*, naming it *Herpetomonas donovani* (LAVERAN and MESNIL).

At present our knowledge of these flagellates of the genus *Herpetomonas* is almost entirely limited to the adult forms very little attention having been paid to their non-flagellate stages and in the majority of the described species this stage is not even known. It will be remembered that Prowazek (5) begins his account of *Herpetomonas muscae domesticae* with the adult flagellate and describes in detail its structure and method of encystment, but makes no mention of the early development of the parasite in the midgut of the fly; so that in the type species of *Herpetomonas* the non-flagellate stage similar to the Leishman-Donovan body is not sufficiently recognised. In order to simplify the study of these flagellates of the genus *Herpetomonas* I have found it convenient to divide their life cycles into three stages, preflagellate, flagellate and postflagellate. In their preflagellate stages they are round or oval bodies with a large nucleus and round or rod-shaped blepharoplast; they multiply by simple longitudinal division as in the case of *Herpetomonas lygaei* or in addition by multiple segmentation as in *Herpetomonas donovani* and the *Herpetomonas* of *Culex pipiens*, which I (1) have recently described. In the species I have studied this stage is passed in the midguts of the larvae, nymphs or adults of their respective insect hosts; in the case of *Herpetomonas donovani* and the parasite of Delhi boil it is passed in man.

The flagellate stage is characterised by the formation of a flagellum and the division and multiplication of the resulting flagellates. In *Herpetomonas donovani* and in the *Herpetomonas* of *Culex pipiens* in addition to this change many of the cells develop into rosettes by the consecutive division of their nuclei and blepharoplasts and on the formation of flagella from eight to twenty or more flagellates are produced. The formation of the flagellum in at least two of the species, *Herpetomonas donovani* and *Herpetomonas muscae domesticae*, is preceeded by the development of what appears to be a vacuole close to the blepharoplast, later the flagellum is seen lying in the vacuole and when the vacuole ruptures it is extruded. In the *Herpetomonas* of *Culex pipiens* and in *Herpetomonas lygaei* the flagellum first appears as a fine pink-staining filament in the achromatic space just anterior to the blepharoplast. None of these flagellates that I have studied have a double flagellum. The flagellate stages of the majority are found in the mid- and hind-guts of the nymphs or adult insects, that of *Herpetomonas donovani* in the mit-gut of *Cimex rotundatus*; the flagellate stage of the parasite of Delhi boil is not yet known.

The postflagellate stages are passed in the rectums of their adult insect hosts. The flagellates after becoming attached to the intestinal epithelium divide more than once and at the same time the free portion of the flagellum becomes detached while the intracellular portion is absorbed. The parasites then become encysted and are attached loosely in masses to the rectal epithelium. The cysts are passed out in the faeces of the insects and are again ingested by the larvae, nymphs or adults as the case may be. In blood-sucking insects infected with these flagellates the cysts are not ingested by the adults as they feed exclusively on blood, but are swallowed by their larvae or nymphs. The presence of harmless flagellates in mosquitoes, fleas and tsetse flies is thus readily explained.

I wish to record the occurrence of a small *Coccidium* in the alimentary tract of *Lygaeus militaris*, as far as I am aware these *Sporozoa* have not previously been recorded from the *Rhynchota*. In conclusion I have to thank Major DONOVAN, I. M. S., for painting the figures on the plate accompaying this paper.

Madras, December 1907.

References to literature.

1) PATTON: Preliminary note on the life cycle of a species of Herpetomonas fonnd in Cnlex pipiens. British Medical Journal 13th Jnly 1907 p. 78.
2) DISTANT: The Fauna of British India, Rhynchota. Vol. II p. 6.
3) HOOKER: The Flora of British India.
4) SHARP: The Cambridge Natural History, Insects. Part II.
5) PROWAZEK: Die Entwicklnng von Herpetomonas, einem mit den Trypanosomen verwandten Flagellaten. (Vorl. Mitteilung.) Arb. a. d. kais. Gesundheitsamte 1904 XX.
6) SCHAUDINN: Generations- und Wirtswechsel bei Trypanosoma und Spirochaete. (Vorl. Mitteilnng.) Arb. a. d. kais. Gesnndheitsamte 1904 XX.
7) KENT: A Mannal of Infnsoria. Vol. 1.
8) LAVERAN and MESNIL: Snr nn Protozoaire nonvean (Piroplasma Donovani LAV. et MESN.) parasite d'nne fièvre de l'Inde. Compt. Rend. des séances de l'Acad. des Sciences Tome CXXXVII p. 957. Séance dn 7 Décember 1903.
9) LÜHE: Mense's Handbnch der Tropenkrankheiten Bd. III, 1. Halbband.
10) LÉGER: Snr qnelqnes Cercomonadines nonvelles on pen connnes parasites de l'intestin des Insects. Arch. f. Protistenk. Bd. II Heft 1 1903.

11) Christophers: A preliminary report on a parasite found in persons suffering from enlargement of the spleen in India. Scientific Memoirs by officers of the Medical and Sanitary Department of the Government of India, New series No. 8.

12) Laveran and Mesnil: Compt. Rend. Soc. Biol. 1901 Tome 53. Ann. de l'Inst. Pasteur 1901, 15 and 1902, 16. Trypanosomes and Trypanosomiases. Paris, June 1904.

13) Patton: The development of the Leishman-Donovan parasite in Cimex rotundatus. Scientific Memoirs by Officers of the Medical and Sanitary Department of the Government of India, New series No. 30.

14) Rogers: Lancet, 3rd June 1905 p. 1484.

Explanation of plate.

Herpetomonas lygaei (Patton).

Fig. 1. Two oval cysts from the crop of *Lygaeus militaris*, note the nuclear membrane in the upper parasite.

Fig. 2. Parasite also from the crop showing commencing division, the blepharoplast is about to divide.

Fig. 3. Two parasites the result of simple longitudinal division, the nuclei and blepharoplasts in each parasite are about to divide again; the chromosomes have divided and passed to the sides and a pale line is seen passing through each nucleus.

Fig. 4. Four cells, the result of simple longitudinal division, in making the film they have become separated.

Fig. 5. Four parasites shewing commencing elongation the anterior ends are becoming pointed, the protoplasm has increased in volume and is more vesicular.

Fig. 6. Four spindle-shaped cells flagellating, the nuclei are commencing to divide, the blepharoplasts are situated close up to the nuclei shewing that each cell is preparing to divide longitudinally; the flagella are seen in all stages of development; note the characteristic pink staining anterior ends of the parasites.

Fig. 9. Group of seven parasites which have originated from four cells similar to those in Fig. 5. One has divided and half has become an adult flagellate, another has elongated and then divided, the third has divided again while the fourth is as yet unchanged. This is the commonest method of development of the groups of four cells.

Fig. 10. Four elongated cells similar to those shewn in Fig. 6, one shows the early formation of the flagellum. The large cell has a very distinct vacuole just anterior to the blepharoplast.

Fig. 11. An adult flagellate; note the position of the blepharoplast about 4 μ from the anterior end.

Fig. 12. An adult flagellate shewing commencing longitudinal division, the new flagellum having developed from a point close to the root of the original one.

Fig. 13. An adult flagellate shewing a further stage of longitudinal division, note the parasites beginning to separate at their anterior ends.

Fig. 17. Stout flagellate just prior to encystment; note the pink staining granules in the anterior end.

Fig. 18. Further stage of a similar parasite; most of the flagellnm has broken off, the blepharoplast is close np to the nncleus as division is abont to begin.

Fig. 19. First division before encystment, note the flagellum has split and a shredded portion joins the two halves; the chromatoid granules are well marked at the posterior end.

Fig. 20. The degeneration of the flagellum, only a few intracellular strands being left.

Fig. 21. Longitudinal division of a such a cell; the parasites are separating at their anterior ends.

Fig. 22. Longitudinal division of two similar cells; each has a well marked vacnole near the blepharoplast.

Fig. 23. Two smaller cells about to divide again, note the large nnclei and blepharoplasts.

Fig. 24. Group of fonr cysts attached by their anterior ends; note the large rod-shaped blepharoplasts which are very characteristic of this stage.

Fig. 25. Three cysts from the dried faeces of *Lygaeus militaris*, note the round blepharoplasts and the periplasts surrounding the parasites.

Herpetomonas donovani (Lav. and Mesn.).

Fig. 7. The two cells on the right are from a splenic blood smear and that on the left is from the peripheral blood of a patient suffering from severe diarrhoea, note this parasite shows four chromosomes in its nncleus.

Fig. 8. Large blne staining cell from the midgut of *Cymex rotundatus* (Signoret), the second day after ingestion; note the pink mass between the blepharoplast and the margin of the cell, it is the developing flagellnm.

Fig. 14. Eight parasites, the result of mnltiple segmentation of two cells, taken from intra vitam splenic pnncture; the cells are lying in the detached protoplasm of an endothelial cell.

Herpetomonas muscae domesticae (Burnett).

Fig. 15. Two young cells shewing the method of formation of the flagellum; in the cell on the left the flagellnm a single stont filament, is just extruded and is uncoiling; in the parasite on the right the flagellnm is on the point of being extrnded. Note the two blne staining bodies in the cells, probably diplosomes (?).

Fig. 16. A young stont flagellate, note the large blepharoplast and the single flagellum.

All the figures were drawn throngh a camera lncida with a Zeiss' No. 2 apochromatic objective, N. A. 1,40 and a Zeiss' compensating ocular No. 12 and are therefore magnified 2700 diameters.

(Ans dem Institut für Schiffs- nnd Tropenkrankheiten in Hamburg.)

Über eine eingeißelige Flagellatenform im Darm der Stubenfliege.

Von

Dr. **Heinrich Werner,**

Stabsarzt der Schutztruppe für Deutsch-Südwestafrika und Assistent am Institut

(Hierzn Tafel II u. III.)

Gelegentlich von Untersuchungen von Stubenfliegenkot, die ich für andere Zwecke vornahm, fand ich eine Flagellatenart, die von der von v. Prowazek eingehend nntersuchten *Herpeotmonas*-Art wichtige Abweichungen anfwies. Es ist nnn von Interesse, daß der von mir beobachtete Parasit weitgehende Übereinstimmung zeigt mit der von Patton bei *Culex pipiens* beschriebenen Art, während diese letztere gegenüber der von v. Prowazek untersnchten Art nach den Angaben Patton's erheblich abweicht.

Es erscheint im Hinblick auf die Wichtigkeit der Unterscheidung von harmlosen *Herpetomonas*-Arten von den von Rogers und Patton beschriebenen geißeltragenden Entwicklungsformen der *Leishmania donovani* von Wichtigkeit, diese harmlosen *Herpetomonas*-Arten der Dipteren, um deren Erforschung sich besonders Léger große Verdienste erworben hat, genau zn kennen.

Ich fand den Parasiten, nnd zwar stets die gleiche Form, bei 4 von 82 untersnchten Stubenfliegen. Seine Länge beträgt in toto 10—13 μ, die des Körpers allein 5—7 μ, die der Geißel 5—6 μ. Die Längenmaße der von Prowazek beschriebenen Form sind die

folgenden: Länge in toto 70—120 μ, Länge des Körpers 30—50 μ, Länge der Geißel 40—70 μ.

Lebend wird der Parasit in lebhafter Bewegung angetroffen, und zwar kann man zwei Haupttypen der Bewegung unterscheiden. Entweder besteht die Bewegung in einem lebhaften Hin- und Herschleudern der Geißel, wobei die Körperachse fortwährend ihre Richtung ändert und die Ortsveränderung gering ist, oder sie besteht in einer schnellen Ortsveränderung in der Richtung des Geißelendes, wobei die Achse des Protoplasmaleibes die gleiche bleibt, während die Geißel sehr schnell schwingt und den Eindruck des Zitterns macht.

An dem Protoplasmaleib sind ein Hauptkern und ein Blepharoplast unschwer zu unterscheiden (s. Fig. 1). Der letztere liegt fast stets vor dem ersteren, doch wird er zuweilen auch neben ihm liegend angetroffen. Zwischen dem Blepharoplasten und dem basalen Ende der Geißel liegt eine nach Giemsa sich rot färbende, längsgestellte Spindel, in deren Mitte ein Chromatinstab verläuft. Die Geißel ist stets einfach und zeigt keine undulierende Membran.

Teilungsformen, die den Typus einer Längsteilung darstellen (s. Fig. 2), habe ich häufig gefunden. Es scheint sich dabei zuerst der Blepharoplast, dann die Geißel und dann erst der Hauptkern zu teilen. Wenigstens habe ich verschiedentlich Formen gesehen, bei denen der Blepharoplast und die Geißel schon geteilt waren, während der Hauptkern noch ungeteilt war. Der den Blepharoplast mit dem basalen Ende der Geißel verbindende Chromatinstab war in diesen Fällen verdoppelt, so daß das Bild stark an den Befund des doppelten Rhizoplasten der von v. Prowazek beschriebenen *Herpetomonas muscae domesticae* erinnerte.

Einer eigenartigen Veränderung an dem Protoplasma des Parasiten möchte ich noch kurz Erwähnung tun.

In dem Kot einer Stubenfliege wurden abends lebende Flagellaten von dem beschriebenen Typus gefunden. Das Präparat wurde nach Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung die Nacht über in Vaselineeinschluß belassen und am nächsten Morgen von neuem durchmustert. Es fanden sich jetzt an den noch lebhaft beweglichen Parasiten, und zwar am hinteren Ende, eigentümliche Spaltungen des Protoplasmas, die alle Übergänge von einer leichten Verbreiterung (s. Fig. 3) und Einkerbung (s. Fig. 4) am hinteren Ende des Protoplasmas bis zu einer bis auf den Geißelansatz eindringenden Zweispaltung (s. Fig. 5) darstellten. Bei vereinzelten Individuen waren zwei Spalte sichtbar, so daß das Protoplasma des Parasitenkörpers

von hinten her in drei Teile (s. Fig. 6) gespalten war, während der Vorderteil des Parasiten noch im Znsammenhange war. Dabei war die Beweglichkeit der Parasiten nicht sichtbar beeinträchtigt. Das in dieser Phase angefertigte Trockenpräparat erwies, daß der Kernapparat bei dieser Spaltung unbeteiligt war; die Erscheinung betraf nnr das nach Giemsa sich blau färbende Protoplasma, während Hauptkern, Blepharoplast und Geißel keine Spur einer Teilnng zeigten.

Eine Deutung dieses eigenartigen Befundes scheint mir bisher noch nicht möglich — der Mangel an Fliegen in der jetzigen Jahreszeit macht mir gegenwärtig eine Wiederholnng des Versuches unmöglich —; jedenfalls scheint er mir zu beweisen, daß in dem Protoplasma der beobachteten Flagellatenart eine Längsorientierung in zwei oder mehr Teile morphologisch vorhanden ist.

Conjugationsformen habe ich nicht gefunden, anch keine Einwanderung in die Ovarien.

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen handelt es sich um eine von der von v. Prowazek beschriebenen, in der Stuben- und Schmeißfliege beobachteten wesentlich abweichende Art. Dafür spricht znnächst die ganz erheblich geringere Größe (Fig. 7 wurde bei der gleichen Vergrößerung wie Fig. 1—6 aufgenommen. Vergr. 1500), dann die einfache Anlage des Geißelapparates, der bei der von v. Prowazek untersuchten Art auch bei dem völligen Fehlen einer Teilung des Kernapparates stets doppelt gebildet gefunden wurde (s. Fig. 8). Diese, die beiden Formen trennenden Charaktere wurden nicht nebeneinander bei Parasiten derselben Fliege gefunden, so daß die Annahme, es handele sich um verschiedene Entwicklungsformen derselben Art, unwahrscheinlich ist.

Ob die von den älteren Autoren beobachteten *Herpetomonas* der von mir beobachteten oder von v. Prowazek beschriebenen Art zuzurechnen sind, ist auf Grund der Beschreibungen schwer zn sagen. Sicher scheint mir, daß Léger dieselbe Art vor sich gehabt hat, die v. Prowazek beschreibt, dafür spricht schon die Bemerkung, daß er die Geißelwurzel häufig doppelt gefunden habe. Auch Stein scheint nach den von Bütschli wiedergegebenen Abbildungen diese Art der *Herpetomonas muscae domesticae* beobachtet zn haben.

Da für die Gattung *Herpetomonas* durch v. Prowazek das Vorhandensein einer doppelten Geißel nachgewiesen ist, nnd da andererseits von Léger für die eingeißeligen Flagellaten mit gerstenkornähnlicher Körperform und vor dem Hauptkern liegendem Blepharoplast die Gattnngsbezeichnung *Crithidia* eingeführt ist, so möchte ich

für die oben beschriebene Flagellatenform die Bezeichnung *Crithidia muscae domesticae* vorschlagen.

Von dem von Lühe gemachten Vorschlage, das Vorhandensein einer undulierenden Membran für die Gattungsbezeichnung *Crithidia* gegenüber *Herpetomonas* als wesentlich anzusehen, glaube ich absehen zu können, da das Vorhandensein einer einfachen oder doppelten Geißel einen genügend charakterisierten Gattungsunterschied darstellt.

Herrn v. Prowazek, der mir bei meinen Untersuchungen seine wertvolle Unterstützung zu teil werden ließ, bin ich für diese sowie für die liebenswürdige Überlassung der für die Abbildungen verwandten Präparate von *Herpetomonas muscae domesticae* zu großem Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis.

Bütschli: Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Leipzig 1889.

Léger, Louis: Sur un Flagellé parasite de l'anopheles maculipennis. C. R. de la Soc. de Biol. T. 54 p. 354.

—: Sur quelque Cercomonadines nouvelles ou peu connues parasites de l'intestin des insectes. Arch. f. Protistenk. Bd. II p. 180.

—: Sur un nouveau Flagellé parasite des Tabenides. C. R. de la Soc. de Biol. T. 57 p. 613.

—: Sur les affinités de l'Herpetomonas subulata et la phylogénie des Trypanosomes. C. R. de la Soc. de Biol. T. 57 p. 615.

v. Prowazek: Die Entwicklung von Herpetomonas, einem mit den Trypanosomen verwandten Flagellaten. Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Berlin Bd. XX p. 440.

Lühe: Die im Blute schmarotzenden Protozoen und ihre nächsten Verwandten. In Mense's Handbuch der Tropenkrankheiten. Leipzig 1906.

Patton: Preliminary note in the Life cycle of a species of herpetomonas found in culex pipiens. Brit. med. Journ. 1907 Nr. 2428.

Tafelerklärung.

Fig. 1. *Crithidia muscae domesticae* im Fliegenkot. (Vergr. 1500.)

Fig. 2. Teilungsform von *Crithidia muscae domesticae.* (Vergr. 1500.)

Fig. 3—6. Spaltungsprozeß des Protoplasmas von *Crithidia muscae domesticae* (s. Text). (Vergr. 1500.)

Fig. 7. *Herpetomonas muscae domesticae* nach einem Präparat v. Prowazek's bei der gleichen Vergrößerung wie Fig. 1—6 aufgenommen. (Vergr. 1500.)

Fig. 8. *Herpetomonas muscae domesticae* nach einem Präparat v. Prowazek's (Vergr. 750.)

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Heidelberg.
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Knauff.)

Die Übertragung von *Plasmodium praecox* auf Kanarienvögel durch *Stegomyia fasciata* und die Entwicklung der Parasiten im Magen und den Speicheldrüsen dieser Stechmücke.

Von

Dr. med. et phil. **R. O. Neumann,**
a. o. Prof. d. Hygiene an der Universität.

(Hierzu Tafel IV—VI.)

Einleitung.

Nachdem durch zahlreiche Menschenversuche der Beweis geliefert worden war, daß infizierte *Stegomyia fasciata* durch den Stich das gelbe Fieber zu übertragen vermögen, so mußte der Schluß auch berechtigt sein, daß diese Stechmücken Entwicklungsformen des Gelbfiebererregers in irgendeiner Form in sich bergen müssen. Alle Nachforschungen, nach dieser Richtung hin haben jedoch noch zu keinem greifbaren Resultat geführt.[1]) Nichtsdestoweniger wird man nach unserer heutigen Erkenntnis in der Übertragung pathogener Parasiten durch Stechmücken aus vielen Analogien den Schluß ziehen können, daß die Stegomyien tatsächlich Parasiten weiter zu entwickeln imstande sind. Bei dieser Sachlage würde es schon einen Schritt vor-

[1]) M. Otto und R. O. Neumann: Studien über das gelbe Fieber in Brasilien. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh. 1905 Bd. 51 p. 357.

wärts bedentet haben, wenn mit Sicherheit der Nachweis gelungen wäre, eine Weiterentwicklung von irgendwelchen anderen nnd genauer bekannten Parasiten, z. B. der Malaria oder Vogelmalaria in der *Stegomyia* festzustellen. Allein anch hierfür fehlte bisher jeder Anhaltspunkt. In der mir zngänglichen Literatur, die über diesen Gegenstand überhaupt nnr Spärliches berichtet, habe ich nichts Positives finden können.

Der erste, der Stegomyien auf eventuelle Entwicklungsstadien von Parasiten zu prüfen Gelegenheit hatte, war R. Ross,[1]) welcher bei seinen berühmten Übertragnngsversuchen von *Proteosoma* dnrch Stechmücken und seinen Malariastudien anch Stegomyien (seine „geringelten" Stechmücken) zu Versuchszwecken heranzog. Er ließ 1895 in Secunderabad Stegomyien an Personen saugen, welche Halbmonde in ihrem Blut zeigten nnd ebenso „geringelte Mücken einer besonderen braunen Art" an Patienten, die an Qnartana litten, ohne daß nachher eine Weiterentwicklung der Parasiten- oder Cystenbildung am Magen eingetreten wäre. Auch in Bangalore ließ er malariakranke Leute von Stegomyien stechen, ohne nachher eine Veränderung in den Mücken gesehen zu haben.

Seine weiteren Studien mit den „großen Mücken" (später als *Culex fatigans* [Wiedemann] bestimmt) nnd dem *Plasmodium praecox* (*Proteosoma*) brachten dann seine bedeutende Entdeckung von der Weiterentwicklung der Parasiten zu Cysten- und zu Sichelkeimen — aber mit *Stegomyia* blieb anch hier der Erfolg ans. Ein Übersehen etwaiger Entwicklungsstadien seinerseits ist auszuschließen! Ross neigt vielmehr, wie er mir persönlich in Liverpool mitteilte, der Ansicht zu, daß das Nichtvorhandensein von derartigen Stadien bei der in Indien vorkommenden Art, möglicherweise in den örtlichen Verhältnissen oder der Lebensweise der Mücke seine Ursache gehabt haben könnte.

Weiterhin sind meines Wissens Stegomyien bis znm Beginn meiner Versuche im Frühjahr 1905 nicht in den Bereich von Übertragungsversnchen mit *Proteosoma* gezogen werden; nur berichtet Ross noch, daß Christophers, Daniels und Stephens acht Arten von *Anopheles* fanden, welche Malaria übertrugen, *Culex* und *Stegomyia* verhielten sich dagegen refraktär. Hier wurde also *Stegomyia* auch für Malariaübertragungsversnche benutzt, nicht für Vogelmalaria.

[1]) Ronald Ross: Untersnchungen über Malaria. 1905. E. Fischer, Jena.

Das was Ross in Indien mit *Proteosoma* an *Culex fatigans* festgestellt hatte, konnte u. a. Koch,[1] Ruge[2]) und Grassi[3]) in Deutschland und Italien bei *Culex pipiens* und *Culex nemorosus* von neuem wiederholen und damit feststellen, daß auch andere Culexarten zur Weiterentwicklung fähig sind. Über den Zusammenhang von *Proteosoma* mit *Stegomyia* konnte ich in der neusten Literatur nur eine einzige Angabe finden: In den Annales Pasteur teilen die Gebrüder Sergeant[4]) mit, daß sie in Algier zwei Stegomyien an einem mit *Proteosoma* infizierten Kanarienvogel saugen ließen und dann 8 Tage später bei einer dieser Mücken eine Cyste in noch unreifem Zustande vorfanden. Aus dieser nur 4 Zeilen langen Notiz ist über die näheren Details des Versuchs nichts Weiteres zu entnehmen, sicher geht aber daraus hervor, daß die Reifung der Cysten und das eventuelle Überwandern der Sichelkeime in die Speicheldrüsen und eine nachherige Übertragung auf andere Vögel nicht beobachtet wurde. Mit dem äußerst geringen Versuchsmaterial von nur zwei Stegomyien ließ sich auch nichts Vollkommeneres eruieren. Immerhin läßt die von meinen Versuchen unabhängig in Algier gemachte Beobachtung doch erkennen, daß die Möglichkeit einer Entwicklung von *Proteosoma* in der *Stegomyia fasciata* bestehen konnte. Mehrere Versuche in dieser Richtung scheinen aber von den Gebrüder Sergeant nicht gemacht worden zu sein; infolgedessen sind wir auch nicht unterrichtet, ob eine vollständige Entwicklung in dem Körper der afrikanischen Stegomyien stattfand. Gleichzeitig will ich auch nicht unerwähnt lassen, daß, wie mir Herr Prof. Fülleborn vom Tropenhygienischen Institut in Hamburg persönlich mitteilte, bei orientierenden Versuchen über die Entwicklungsmöglichkeit von *Proteosoma* in der *Stegomyia*, unabhängig von meinen Versuchen, von ihm und Herrn Stabsarzt Dr. Werner Ookineten im Magen der *Stegomyia* gesehen wurden. Eine weitere Entwicklung etwa bis zu Cysten oder Sichelkeimen in der Speicheldrüse konnte damals jedoch ebenfalls nicht beobachtet werden.

[1]) R. Koch: Über die Entwicklung der Malariaparasiten. Zeitschr. f. Hyg. und Infektionskrankh. Bd. 32 p. 1.

[2]) R. Ruge: Untersuchungen über das deutsche Proteosoma. Centralbl. f. Bakt. I Bd. 29 Nr. 5.

[3]) B. Grassi: Die Malaria-Studien eines Zoologen. Jena (Fischer II. Aufl. 1901.

[4]) Ed. et Et. Sergeant: Études sur les Hématozoaires d'Oiseaux. Ann. de l'Inst. Pasteur 1907 XXI p. 255.

Untersuchungsmethodik und Technik.

Die Stegomyien, welche zu den Versnchen benutzt wurden, stammten aus der Zeit der Studien über das Gelbfieber, die M. Otto und ich gemeinsam in Brasilien im Jahre 1904 nnd später im Hambnrger Tropenhygienischen Institnt fortgesetzt hatten. Ich habe die Mücken dann seit Februar 1905 im hiesigen Institnt weiter fortgezüchtet und bisher*) über 75 Generationen erhalten können. Eine Reihe späterer Versnche wurde anch mit Afrikanischen Stegomyien ausgeführt, die aus Togo stammten.[1]) Ansführliches über die Lebensweise der Stegomyien zu berichten, nnterlasse ich an dieser Stelle. Interessenten finden vieles davon in nnseren früheren Berichten.[2]) Ich teile nur einiges mit über die von mir geübte Technik des Stechen- und Saugenlassens, über die Aufbewahrnng der infizierten Mücken nnd über die Untersuchungsmethodik der Mückeneingeweide, Dinge, die znm Verständnis der Versuche nnd für eventuelle Nachprüfungen von Wert sein können.

Alle Entwicklungs- nnd Übertragnngsversnche, die bei *Stegomyia fasciata* angestellt und verfolgt wurden, habe ich anch mit *Culex pipiens* in Parallelversnchen wiederholt und zwar unter absolnt gleichen änßeren Verhältnissen, gleicher Temperatur, gleicher Feuchtigkeit nnd gleicher Nahrnng.

Der Zweck war folgender: Da man bei der Infektion von *Culex pipiens* alle Entwicklnngsphasen des *Proteosoma* kennt nnd nnter normalen Verhältnissen auch stets eine Infektion der Culexmücken nebst Cystenbildung zustande bringt und beobachten kann, so hätte sich, da mit beiden Mückenarten nnter ganz denselben Bedingungen die Versuche angestellt wurden, ein Mißlingen der Übertragung anf *Stegomyia* leicht auf seine richtige Ursache zurückführen lassen.

Das Ansgangsmaterial für beide Arten von Mücken waren Eier, welche in der Gefangenschaft ausliefen nnd sich weiter zu Larven, Puppen und Imagines entwickelten. Die Zucht wurde fortgesetzt bis eine größere Menge weiblicher Tiere zn Stechversuchen vorhanden waren. Ich hielt sie in Aquarien, welche mosqnitosicher verwahrt, resp. in großen Kästen, die an den Breitseiten mit Glas, an der vorderen oberen nnd hinteren Seite mit Gaze verschlossen waren.

*) Februar 1908.

[1]) Ich erhielt dieselben durch die Freundlichkeit von Herrn Physikus Dr. Otto in Hamburg.

[2]) M. Otto und R. O. Neumann l. c.

Die Fütterung gelang im Sommer mit Kirschen, süßen Birnen, Bananen oder falls dieses Material nicht zur Hand war und im Winter mit Honig oder Znckerlösung. Benutzt man Zuckerlösung, so ist streng daranf zn achten, daß die Zuckerlösnng selbst oder die mit Zuckerlösnng getränkte Watte täglich ernenert wird, weil sich sonst sehr leicht Schimmelpilze nnd Bakterien entwickeln, die den Mücken gefährlich werden können. Anßerdem wird sie leicht sauer nnd ist alsdann für die Tiere nngenießbar.

Blnt bekamen die Mücken niemals vor ihrer eigentlichen Bestimmnng, proteosomahaltiges Kanarienvogelblnt zu saugen. Es wnrde dadnrch der Blnthunger gereizt und anch die Möglichkeit erhöht, bald nach dem Ansetzen zn stechen. Man kann die Mücken anch mit vegetabilischer Nahrnng — auch die Weibchen — bei einiger Aufmerksamkeit wochenlang am Leben halten.

Nebenbei sei nnr bemerkt, daß die Aufzncht von *Culex pipiens* in der Gefangenschaft unter Umständen mehr Aufmerksamkeit erfordert als die Entwicklung von Stegomyia und zwar in bezug anf die Fütterung der Larven.

Früher gaben wir ihnen Maiskörner im aufgeqnollenen Znstande, ebenso den *Stegomyia*-Larven, jetzt bin ich zur Fütterung mit Weißbrot übergegangen nnd habe gute Erfolge gesehen. Aber auch hier muß Sorge getragen werden, daß das Wasser, worin die Larven sich befinden, erneuert wird, sobald es sich trübt, da die übrigbleibenden Brotreste sänern nnd in dem sauren Medium die Larven zngrunde gehen.

Das Sangenlassen der Mücken an Kanarienvögeln stößt auf manche Schwierigkeiten. Die wichtigste Sorge ist die, daß zu der Zeit, wo ein Kanarienvogel eine reiche Menge männlicher und weiblicher Gameten enthält auch genügend sangfähige Mückenweibchen vorhanden sind. Denn ein Operieren mit nur einigen Exemplaren hat gar keinen Zweck, weil erstens nicht alle Mücken, die zu ihrem Opfer gesetzt werden, saugen, zweitens, weil immer einige Mücken — voransgesetzt, daß nicht alle Vorsichtsmaßregeln getroffen sind — von dem Kanarienvogel weggefangen oder zerdrückt werden und drittens weil man eine Unmenge von Mücken für die Präparation nötig hat. Denn wenn die Entwicklnng der Parasiten im Mückenmagen, die Copulation, das Ausschwirren der Mikrogameten, das Wachstum der Ookineten, später die Heranbildung der Cysten nnd das Verhalten der Sichelkeime in den Speicheldrüsen genan beobachtet werden soll, so mnß man in den

ersten 60 Stnnden allein alle 10—15 Minuten eine oder mehrere Mücken opfern, später täglich bis zu 14 Tagen mehrere pro Tag. Denn nicht jedes Präparat gelingt und besonders das Isolieren der Speicheldrüsen stellt an das Material große Ansprüche. Zieht man ferner in Betracht daß, wie wir später sehen werden, nnr bei verhältnismäßig wenig Stegomyien die Weiterentwicklung der Ookineten zu Cysten und der Übergang in die Speicheldrüsen erfolgt, so ist daraus ersichtlich, daß wiederum eine große Anzahl Mücken geopfert werden müssen, um über die Prozentzahl der mit Cysten infizierten einen Anhaltspunkt gewinnen zu können.

Da es unmöglich ist in einer Periode der Entwicklung vom Saugen der Mücke an bis zum Übergang der Sichelkeime in die Speicheldrüsen, alle Stadien genau zu verfolgen, so mußten mehrere größere Mengen Stegomyien oder *Culex* an verschiedenen infizierten Kanarienvögeln und zu verschiedenen Zeiten saugen. Auf diese Weise habe ich innerhalb von 7 Monaten über 2500 Stegomyien und über 350 Culex zu Infektionszwecken verwendet, eine Zahl, welche erlauben dürfte einen richtigen Schluß auf die Häufigkeit des Auftretens von Cysten zu geben.

Anfänglich setzte ich den infizierten Kanarienvogel frei in einen Netzkasten, wo sich eine große Reihe zu infizierender Stegomyien befanden. Da derselbe aber alsbald die um ihn herumsummenden Mücken wegschnappte, brachte ich ihn in ein kleines Drahtkästchen, worin er sich nur noch rühren und umdrehen konnte. Aber auch hier fanden die Stegomyien bei dem unruhigen Gast nicht Gelegenheit, sich mit ihren Stechwerkzeugen in die Haut einzubohren. Deshalb wickelte ich ihn später in ein dünnes weitmaschiges Drahtnetz so ein, so daß er sich nicht mehr bewegen konnte. Die Mücken suchten zunächst die am leichtesten zugänglichen Stellen ohne Federn auf z. B. die Beine. Da ich jedoch sah, daß die Mücken hier nur spärlich Blut fanden, so schnitt ich allen später verwandten Kanarienvögeln die Federn möglichst kurz, um den Mücken den Stechakt bequemer zu machen. Dadurch gelang es jedesmal eine Reihe von ihnen zum Saugen zu veranlassen. Die Vögel mußten in ihrem kleinen Gefängnis 1—3 Stunden, manche auch über Nacht verweilen, damit auf einmal möglichst viele aus ein und derselben Infektionsperiode des Vogels Blut genießen konnten.

Der Saugakt dauerte bei beiden Mückenarten 1—4 Minuten bis sie sich dick vollgesogen hatten. Eysel [1]) berechnet die Zeit-

[1]) Eysel: Die Stechmücken. In Mense's Handb. der Tropenkrankh. II p. 76.

dauer des Saugens auf 70—110 Sekunden bei „Stechmücken“, wobei aber nicht angegeben ist, ob es sich um *Anopheles* oder *Culex* handelte. Offenbar beruhen die Zeitunterschiede darauf, daß die Mücken nicht jedesmal eine genügend weite Capillare auffinden. Bei den Stegomyien geht der Saugakt meist schneller vor sich als wie bei *Culex*.

Steigen die Mücken von ihrem Opfer herunter — ein „Fliegen“ ist es nicht mehr — so bleiben sie gewöhnlich in nächster Nähe des Vogels sitzen oder kriechen ganz träge ein Stück weiter, um dort zunächst mehrere Stunden ruhig zu verdauen. Sie sind so wenig beweglich, daß man sie mit einer Pinzette anzufassen vermag. Jede Mücke, die den Saugakt beendet hatte, wurde auf diese Weise oder im Nocht'schen Fangglas gefangen, der Zeitpunkt des Saugens genau notiert und sie zur weiteren Untersuchung ihres Magens anfgehoben.

Alle die Mücken, welche längere Zeit wegen der Cystenbildung beobachtet werden sollten, kamen in verschiedene Netzkästen und wurden wie oben weitergefüttert.

Um die Mücken zum Saugen besser zu bewegen, ist es rationell, wie es auch Ruge schon ausprobiert hat, denselben vorher einige Tage nur Wasser zu reichen. Dies gilt für *Anopheles, Stegomyia* und *Culex*. Die Stegomyien saugen auch leicht am Vogel, wenn man sie erst eine Zeitlang mit Zuckerlösung füttert, ihnen dann 2 Tage nur Wasser gibt und sie noch 1 Tag hungern läßt.

Die Schwierigkeit *Culex* zum Saugen zu bringen, welche sich bereits für die Überwinterung eingerichtet haben und die nach Ruge erst 8—14 Tage bei 24—30° gehalten werden müssen, kann man umgehen, wenn man Eier auslaufen läßt und die Larven sofort in wärmere Verhältnisse bringt. Die ausgeschlüpften Imagines verhalten sich dann genau so wie die Imagines der Stegomyien und saugen ebenso leicht, nachdem man sie vorher hat hungern lassen. Die *Stegomyia*-Weibchen saugen das erstemal Blut schon wenige Tage nach dem Ausschlüpfen aus der Puppe. Bei *Culex* dauert es meist viel länger, ehe sie Blut nehmen.

Die Stegomyien sind von den bekannten drei Stechmückenarten, *Anopheles*, *Culex* und *Stegomyia* wohl die gierigsten. Sie fallen gewöhnlich über das zum Saugenlassen bestimmte Tier sofort her, unabhängig ob es abends oder am Tage ist. Die Culex dagegen sind am Tage nicht leicht zum Saugen zu veranlassen, weshalb

[1]) Ruge: Einführung in das Studium der Malariakrankheiten. Jena (Fischer) II. Aufl. 1906 p. 298.

man die Stechversuche mit diesen Tieren rationeller gegen **Abend** vornimmt, sobald Dunkelheit eintritt. Es ist auch dann bei diesen Tiereu nicht nötig, sie in Draht einznwickeln, weil sie die **Mücken** in der Dunkelheit nicht leicht abfangen können.

Die Temperatur spielt insofern eine Rolle, als die Stegomyien am ehesten bei einer Temperatnr stechen, die zwischen 25—28° liegt. Sie tun es auch, wenn man sie hungern läßt und einige Zeit bei niederer Temperatnr hält, etwa bei 20—22°, aber ungern. Frisch eingefangene *Culex* stechen bei gewöhnlicher Zimmertemperatur von cr. 20°, falls sie überhaupt saugen wollen, ohne weiteres. Bei höheren Temperatnren etwa bei 25—28° sangen sie ebenfalls, sobald sie an diese Temperatnr gewöhnt sind oder wenn man sie bei dieser Temperatur aus Eiern gezüchtet hat.

In meinen Versucheu habe ich deshalb die aus Eiern gezüchteten *Culex* und Stegomyien in einem auf 27° konstant gehaltenen Zimmer aufbewahrt, einzelne Serien jedoch auch, um den Unterschied in der Entwicklung der Cysten bei verschiedenen Temperaturen zu stndieren. bei 20° gehalten.

Die Lust zum Saugen scheint zu verschiedenen Zeiten und bei den verschiedenen Mücken, vielleicht auch unter den Mücken der einzelnen Gelege recht verschieden zn sein. Ich habe bei den Stegomyien z. B. die Imagines aus 24 verschiedenen Eigelegen benutzt und folgende Ergebnisse erhalten:

1.	Von	154	weiblichen	Stegomyien	saugten	30
2.	„	192	„	„	„	50
3.	„	161	„	„	„	127
4.	„	40	„	„	„	6
5.	„	39	„	„	„	21
6.	„	238	„	„	„	79
7.	„	60	„	„	„	32
8.	„	320	„	„	„	15
9.	„	79	„	„	„	8
10.	„	42	„	„	„	13
11.	„	16	„	„	„	6
12.	„	20	„	„	„	5
13.	„	62	„	„	„	19
14.	„	160	„	„	„	17
15.	„	257	„	„	„	197
16.	„	12	„	„	„	10
17.	„	23	„	„	„	21
18.	„	125	„	„	„	19

19.	Von	250	weiblichen	Stegomyien	saugten	34
20.	„	66	„	„	„	37
21.	„	39	„	„	„	8
22.	„	18	„	„	„	7
23.	„	50	„	„	„	4
24.	„	27	„	„	„	24

Hieraus geht hervor, daß bald der größere Teil, bald nur die geringere Anzahl Mücken zum Saugen zu veranlassen sind, denn es schwankt die Zahl derjenigen, die Blut gesogen haben von 4,7—91 Proz. Im ganzen haben von 2573 Stegomegiaweibchen nur 789 Blut gesogen, das sind 30,7 Proz.

Bei den *Culex*-Mücken ist die Prozentzahl derer, die Kanarienvogelblut aufnahmen günstiger.

Es sogen von 365 Mücken 234 = 64 Proz.

Will man einen Schluß aus diesen Beobachtungen ziehen, so liegt die Annahme nahe, daß die Stegomyien nicht gern, vielleicht nur gezwungen, an Vögel herangehen, um Blut zu saugen, sich vielmehr lieber des Säugetierblutes bedienen. Dagegen scheint für die *Culex* das Vogelblut eine natürlichere Nahrung zu sein. Macht man das Saugexperiment umgekehrt nnd läßt Stegomyien und *Culex* an Ratten beispielsweise saugen, so beobachtet man, daß die Stegomyien sofort, die *Culex* dagegen nur ganz allmählich, vielleicht nur mit Widerwillen herangehen. Und macht man das Experiment am Menschen, wie ich es zur Prüfung dieser Fragen an mir angestellt habe, in einem Raum, in welchem gleichviel bluthungerige Stegomyien und *Culex* freigelassen sind, so wird man ganz nnweigerlich von den Stegomyien zuerst gestochen, während die *Culex* sich erst später heranwagen.

Nachdem die Tiere Blut gesogen haben und nach einigen Tagen die Verdauung zu Ende ist, so sind sie entgegen anderer Meinung wiederum in der Lage von neuem Blnt aufzunehmen, auch wenn sie mit Proteosomablnt infiziert waren und eine weitere Entwicklung der Parasiten vor sich geht. Ich habe ein wiederholtes Saugen bei Stegomyien beobachtet, in zwei Fällen bis zu 3 mal, in einem Falle sogar 5 mal in Zwischenräumen von 7—10 Tagen, wenn man nur dafür sorgt, daß die Mücken ihre Eier in Wasser ablegen können und für eine neue Copulation mit Männchen Sorge trägt.

Die Beobachtung Ruge's,[1]) daß die *Culex*-Mücken nach Aufnahme von stark proteosomahaltigem Blut leicht an der Malaria-

[1]) Ruge: Malaria usw. l. c. p. 298.

infektion sterben, konnte ich nur ganz ausnahmsweise machen. Ich habe *Culex* sowie Stegoymien nur an Kanarienvögeln saugen lassen, welche sehr stark infiziert wareu, in einigen Fällen sogar kurz nach dem Saugakt der Mücken an ihrer Infektion verendeten, und trotzdem fast gar keine Verluste gehabt.

Es starben von den 789 Stegomyien, welche Blut gesogen hatten nur 26, von den 234 Culex nur 8. Wäre das stark infektiöse Blut daran schuld gewesen, so hätten wahrscheinlich eine bedeutend größere Menge Mücken absterben müssen.

Um ein Wort über die Proteosomavögel zu erwähnen, so möchte ich hervorheben, daß ich zur Weiterimpfung, wie es auch vielfach anderwärts geübt wird, einen Teil oder das ganze Blut eines infizierten Kanarienvogels in den Brustmuskeln injizierte. Ob mit physiologischer Kochsalzlösung oder 3 proz. Natriumcitratlösung verdünnt oder unverdünnt ist gleichgültig. Der Impferfolg bleibt kaum aus. Nur einmal sah ich unter den 32 verwendeten Kanarienvögeln, daß die Infektion nicht anging, woraus hervorzugehen scheint, daß hier nnd da doch ein Kanarienvogel gegen Proteosomainfektion refraktär sein kann.

Bei der Infektion in die Bauchhöhle bleibt zuweilen der Erfolg aus oder aber die Parasitenanreicherung im Blut wird stark verzögert. Bei der Brustmuskelinfektion dagegen hat man es ziemlich genau in der Hand, eine Maximalinfektion in einer gewissen Zeitperiode zu erzielen. Spritzte ich 0,5 ccm + 0,5 NaCl lösung in den Brustmuskel ein, so waren die Vögel zwischen 7—9 Tagen auf der Höhe der Infektion angelangt, d. h. die meisten Blutkörperchen enthielten Parasiten und außerdem war das Blut voll von Gametocyten. In dieser Zeitperiode wurdeu auch die Mücken angesetzt. Von den 32 Kanarienvögeln, welche künstlich infiziert waren, ist nur ein einziger immun geworden, alle anderen starben am 10.—14. Tage.

Blutproben für die Untersuchung über die Menge der vorhandenen Parasiten entnahm ich dem Flügelende. Ist etwa ein infizierter Kanarienvogel wieder Erwarten vor der Entnahme des Blutes gestorben, so gelingt es auch noch bis zu 24 Stunden nach dem Tode des Vogels mit seinem Blut ein anderes Tier zu infizieren.

Über die Technik bei der Sektion und Untersuchung der Mücken kann man bei Ruge[1]) und bei Eysell[2]) nachlesen.

[1]) Ruge: Malaria l. c. p. 301 ff.

[2]) Eysell: in Mense l. c. p. 74 ff.

Ich füge nur einige Bemerkungen hinzu über Punkte, die ich als praktisch gefunden habe.

Will man eine einzelne Mücke aus dem Netzkasten herausholen, so benutzt man das Nocht'sche Fangglas. Braucht man eine größere Anzahl auf einmal — so z. B. wenn man in einem Käfig, wo zahlreiche Mücken enthalten sind, die Männchen und Weibchen voneinander trennen will —, so ist es am besten, sämtliche zu chloroformieren, indem man einen mit etwas Chloroform getränkten Wattebausch in den Kasten hineinlegt oder Chloroform oben auf die Gaze des Kastens auftropft. In kurzer Zeit fallen die Mücken zu Boden und es ist dann leicht sie in der Narkose herauszusuchen. Man sieht den gegebenen Zeitpunkt für das Aufhören der Narkose darin, daß die Mücken, alle sechs Beine *einzeln* von sich zu strecken beginnen. Sterben sie in der Narkose, so ziehen sie stets alle sechs Beine zusammen und strecken sie wie in einem Bündel zusammenliegend, aus.

Die Präparation des Magens gelingt leicht. Handelt es sich um Herstellung von Präparaten für den hängenden Tropfen oder um ungefärbte Ausstrichpräparate, so entnehme ich vom Mageninhalt, den man durch Ausdrücken leicht erhält eine Kleinigkeit, verdünne dieselbe mit einer Spur physiologischer Kochsalzlösung und bringe das Tröpfchen zur weiteren Untersuchung unter Vaselin- oder Canadabalsamverschluß unter ein Deckgläschen. Koch untersuchte die lebenden Parasiten in einer Mischung von Taubenblutserum und Kochsalzlösung. Ich habe Kanarienvogelblutserum und Kochsalzlösung benutzt, aber keinen wesentlichen Vorteil von der Aufschwemmung des parasitenhaltigen Blutes in reiner Kochsalzlösung gesehen.

Die Beobachtung der Weiterentwicklung der Parasiten braucht nicht bei erhöhter Temperatur zu erfolgen, man sieht alle Phasen bereits bei Zimmertemperatur eintreten.

Die für *die Färbung bestimmten Präparate* habe ich entweder mit Alkohol absolut. oder mit Osmiumsäure fixiert. Besonders wenn man letzteres Fixationsmittel noch bei dem nicht eingetrockneten Präparat benutzt, erhält man in der Zeit, wenn die Microgameten ausschwärmen sehr naturwahre Bilder und man kann die Microgameten in ihren Bewegungen sehr schön festhalten. Leider bekommen die nachher mit *Giemsalösung* gefärbten Osmiumpräparate einen blauen Ton, der manche Feinheit des Präparates verschleiern kann. Dagegen die mit Alkohol fixierten Präparate geben die bekannte herrliche Färbung im Drei- oder Vierfarben-

gemisch, besonders wenn man mit verdünnter Lösung (10 Tropfen auf 15 Wasser) und ³/₄—1 Stunde lang färbt. Ganz dasselbe gilt von den Präparaten von Sichelkeimen ans den Speicheldrüsen.

Zur Untersuchnng der Cysten am herauspräparierten Magen verwende ich ebenfalls Kochsalzlösung, nicht wie Schaudinn es tat, Abdominalflüssigkeit von Stechmücken. Enthält der Magen noch nnverdautes Blut, was vielfach, wenn sich die jungen Cysten schon entwickeln der Fall ist, so mache ich einen kleinen Schnitt in den Magen nnd spüle ihn dann in einer größeren Menge Kochsalzlösung aus. Ruge entfernt das Blnt aus dem Magen durch Anffallenlassen eines Deckgläschens und öfteres nenes Hinzufügen von Kochsalzlösnng. Ich habe gefunden, daß die erstere Methode etwas schonender ist, da schon beim Liegenlassen der mit Blut gefüllten Magen in Kochsalzlösung dasselbe allmählich heraussickert, wohl auch hindurchdiffundiert.

Derartige Magencystenpräparate habe ich anf verschiedene Art einzubetten nnd als Dauerpräparate aufzuheben versncht:

1. In Chlornatriumlösung 0,8 Proz. (Verschlnß mit Glyceringelatine nnd Canadabalsam darüber);
2. in Formalinwasser 2 Proz. (Verschluß ebenso);
3. in Chlornatriumformalinwasser aa. part. (Verschluß ebenso);
4. nach Fixation mit Osmiumsänredämpfen direkt in Glyceringelatine (Verschluß mit Canadabalsam);
5. nach Fixation mit Osmiumsäuredämpfen, Alkoholreihe, Xylol, Canadabalsam (Verschlnß nicht nötig);
6. nach Fixation mit Osmiumsäuredämpfen direkt in Formalinwasser (Verschluß Glyceringelatine und Canadabalsam darüber);
7. nach Snblimatfixierung, Auswaschen mit Jodalkohol, Alkoholreihe, Xylol, Canadabalsam (Verschluß nicht nötig);
8. nach Sublimatfixiernng nsw. Alkoholreihe in Glycerin (Verschluß Glyceringelatine und Canadabalsam darüber);
9. nach Osminmsäurefixierung, Glycerinwasser, in Glycerin (Verschlnß wie bei 8).

Ganz dieselben Methoden kamen auch bei Speicheldrüsenpräparaten in Betracht.

Alle benutzten Arten der Konservierung und Einbettung lassen sich anwenden, aber alle kranken daran, daß nach gewisser Zeit, bei einer Methode schneller als bei der anderen, die nach direkter Entnahme im lebensfrischen Präparat so dentlich sichtbaren Kontnren der Magenepithelzellen, der Cystenmembran nnd Sichelkeime, ebenso der Speicheldrüsenzellen nnd der darin enthaltenen Sichel-

keime, undentlich nnd verwaschen werden. Das Lichtbrechungsvermögen geht verloren und das ganze Präparat wird bis auf einige dunklere Linien ganz durchsichtig. Sogar die charakteristischen Tracheen auf dem Magen können nnsichtbar werden. Außerdem finden sich später sehr häufig braunschwarze Punkte und Niederschläge über das ganze Präparat verstrent.

Die besten Ergebnisse für ein danerndes gutes Erhalten sind noch mit der Osminmsänrefixiernng zu erhalten nnd zwar, wenn man nicht nnr 5—6 Seknnden, sondern bis 40 Sekunden fixiert. Die Präparate erhalten dadnrch zwar einen gelben bis braungelben Ton, der jedoch das Bild an sich nicht alteriert. Ob Canadabalsam nach vorheriger Alkoholreihe oder Formalinwasser oder Gelatine als Einbettungsmittel dabei benutzt wird, ist dann ziemlich gleichgültig, Canadabalsameinbettung ist jedoch vorznziehen. Auch mit heißer Sublimatlösung behandelte Präparate, die später in Formalinwasser oder Canadabalsam gelegt werden, halten sich zum Teil gnt. Glycerin macht vielfach zu durchsichtig.

Bei der Präparierung von Stegomyiamägen ist zn beachten, daß dieselben sich nach der Isolierung aus dem Körper in der Präparierflüssigkeit gewöhnlich sofort stark kontrahieren,[1]) so daß in der Beobachtung der Magenstrnktnr nnd der Cysten Schwierigkeiten entstehen. Man kann die starke Zusammenziehung verhindern oder auch — allerdings schwieriger — wieder ausgleichen, wenn man den Magen direkt nach der Isolierung in nur ganz wenig Kochsalzlösung bringt, so daß er noch am Objektträger haften bleibt und ihn dann mit einer Nadel zn strecken oder in die Länge zu ziehen versucht. In diesem ausgestreckten Zustand ist er dann sofort in Formalin, heißer Sublimatlösung oder Osmiumsäure zu fixieren.

Will man Cystenpräparate nnd Speicheldrüsenpräparate im gefärbten Zustande aufbewahren, was entschieden für Dauerpräparate zu empfehlen ist, so härtet man bequem mit 5 Proz. Formalinwasser, alsdann Alkohol 60 Proz. und färbt mit Hämatoxylin. Nach Differenziernng bis zur satten Blanviolettfärbung in Leitungswasser schließt man die Alkoholreihe nnd Canadabalsam an. Alle Konturen und Umrisse bleiben danernd gut zu erkennen. Auch nach Fixierung mit heißer Sublimatlösung nnd Auswaschen mit Jodalkohol läßt sich gut mit Hämatoxylin färben.

Die Speicheldrüsen wurden stets mit bloßem Auge nnd

[1]) Der Magen der *Culex* kontrahiert sich kaum und ist leichter zu untersuchen.

zwei Skalpellnadeln unter Zuhilfenahme einer schwachen Vergrößerung zur Kontrolle, präpariert. Ich bevorzuge dabei einen Querschnitt durch den Thorax direkt hinter dem Hals mit Zurücklassung eines kleinen Teiles Thorax und nachheriges Heranspräparieren der Drüsen, was nach einiger Übung meist gut gelingt.

Für Schnittpräparate durch den Magen oder die ganze Mücke oder die Speicheldrüsen hat mir die Methode der Celloidin und Paraffineinbettung mit vorheriger Entwässerung durch Aceton, wie sie Eysell[1]) angibt, gute Resultate geliefert. Die Schnitte werden später mit Hämatoxylin gefärbt.

Verhalten des infizierten Vogelblutes im Magen des Stegomyia.

Sind die Stegomyien hungrig und werden beim Saugakt nicht gestört, dann nehmen sie Blut bis zum maximalen Füllungsvermögen des Magens auf. Sie begnügen sich aber auch mit weniger, falls sie beim Saugen gestört werden. Haben sie den Magen schon über die Hälfte des Füllungsvermögens mit Blut angefüllt, so gehen sie in der Regel nicht noch ein zweites Mal an den Vogel, sondern verdauen erst die vorherige Mahlzeit. Ruge[2]) gibt an, daß *Anopheles*-Weibchen in ihrem Magen 2,2 cmm Blut aufzunehmen vermögen. Ich habe bei Stegomyien diesen Punkt genauer verfolgt und dabei ermitteln können, daß ein *Stegomyia*-Weibchen in seinem Magen bei maximaler Füllung 1,6 mg Blut aufnimmt. Ich ließ zu diesem Zweck 100 Weibchen, welche frisch ausgekrochen waren, 10 Tage lang von Zuckerlösung sich nähren, gab ihnen dann 4 Tage nur Wasser und ließ sie noch 1 Tag hungern. In diesem Zustande wurden sie chloroformiert und in einem vorher getrockneten Wägegläschen gewogen. Das Gewicht betrug 0,1283 g, d. i. pro Mücke 1,3 mg. Darauf wurden sie an verschiedene Kanarienvögel auf einmal angesetzt, bis sie sich ungestört vollgesogen hatten, wiederum chloroformiert und wieder gewogen. Jetzt betrug das Gewicht 0,2910 g, d. i. pro Mücke 2,9 mg. Es hat also eine Mücke im Durchschnitt 1,6 mg Blut aufgenommen. Auf diese Art glaube ich ein einwandfreieres Resultat erzielt zu haben, als wenn ich verschiedene mit Blut gefüllte Mägen hätte herauspräparieren und einzeln wiegen wollen. Interessant ist, daß diese kleinen Tiere weit mehr als ihr eigenes Gewicht an Blut aufnehmen können. Nebenbei gebe ich aus rein biologischem Interesse

[1]) Eysell: Die Stechmücken. In Mense l. c. p. 75.
[2]) Ruge, Malaria l. c. p. 298.

auch das Gewicht von 100 männlichen Stegomyien an, die in gleicher Weise und unter denselben Verhältnissen gewogen wurden, wie die Weibchen. Es betrug 0,0866 g d. i. pro Mücke 0,86 mg. Da die Männchen bekanntlich nicht Blut saugen, so ist darüber natürlich nichts auszusagen, wie viel sie aufnehmen würden. Aus den Gewichtsdifferenzen der Männchen und Weibchen geht hervor, daß die Männchen weit schmächtiger sind als die Weibchen, was auch dem makroskopischen Aussehen entspricht.

Nach Aufnahme des Blutes sind die Mücken dick angeblasen und ihr Magen scheint gegen das Licht gehalten leuchtend rot. Nach kurzer Zeit sieht man, daß die hintere Partie des Magens dunkler wird und eine vordere hellere Zone sich abscheidet d. h. es trennen sich die Blutkörperchen vom Serum. Ich stimme hier mit Eysell [1]) überein, wenn er annimmt, daß die Scheidung der Blutkörperchen vom Serum nur auf der Schwerkraft beruhe und auf der mit dem Hinterleib nach unten gerichteten Sitzweise.

Alsbald beginnt nun die Verdauung des Blutes, d. h. die Lösung des Hämoglobins und der Zerfall der roten Blutkörperchen, was sich makroskopisch durch Kleinerwerden des Magens und die dunklere schwarzrote bis schwarzbraune Farbe kundgibt. Im Magen bleibt dann, wie man sich leicht beim Herauspräparieren desselben überzeugen kann, eine schwarzbraune zähe Masse zurück, die aus hämatogenen Pigment besteht.

Durch Lühe [2]) darauf aufmerksam gemacht, daß der Kot der Mücke ein gutes Hilfsmittel bilde, um den Stand der Verdauung des Blutes im Magen zu beurteilen, habe ich die Abscheidung desselben bei den Stegomyien ebenfalls verfolgt und kann Lühe's Beobachtungen bestätigen. Auch hier treten allmählich zu den abgesetzten schwarzkörnigen Pigment enthaltenden Kot, allmählich immer mehr und mehr, entsprechend der weiter schreitenden Verdauung, Exkrete der Malpighi'schen Gefäße bei und lassen dem Kot immer heller erscheinen, bis er fast nur noch weißlich aussieht, besonders wenn die Mücken später wieder Zuckerlösung aufnehmen. Die Verdauung des Blutes hängt ganz von der Temperatur ab. Ich beobachtete bei den Stegomyien, daß bei einer Temperatur von 27° die Verdauung — makroskopisch beobachtet — innerhalb 2 bis 3 Tagen vollendet ist. Nach 48 Stunden ist meist die Füllung des Magens wieder die normale, aber bei der Präparation finden sich

[1]) Eysell: Stechmücken l. c. p. 54.
[2]) Lühe: In Mense III l. c. p. 165.

stets Reste von Blut noch am Ende des dritten Tages. Bewahrt man die Mücken bei 20° auf, so verzögert sich die Verdanung wesentlich und es danert 4—6 Tage, ehe alles Blut aufgezehrt ist. Ja, ich habe in einigen wenigen Fällen sogar nach 9—11 Tagen noch Spuren von Blut im Magen vorgefunden, nachdem schon Cysten mit Sichelkeimen vorhanden waren. *Culex* verhält sich ganz ähnlich. Lühe fand ebenfalls bei *Culex* die Verdauung des Blutes bei 26° in 2 Tagen vollendet, bei 8° erst nach 6—8 Tagen und Ruge beobachtete bei *Anopheles*, daß bei 30° in 36 Stnnden alles Blut verdant war, bei 10° erst nach 4 Tagen.

Untersucht man nnn das anfgenommene Blut während des Verdauungsprozesses, so findet man bereits im Stegomyiamagen nach wenigen Minuten, selbst nach 1 Minnte nach dem Saugakt, den Beginn des Blutkörperchenzerfalls. Derselbe hält mit der Eindickung nnd der makroskopischen Verändernng des Blutes nngefähr gleichen Schritt, so daß z. B. bei langsamer Verdauung in kühlerer Temperatur nach 4 Tagen, wenn noch Spuren von Blnt im Magen vorhanden sind, anch stets noch einzelne unzersetzte rote Blutkörperchen angetroffen werden. Die Hanptmasse ist zerfallen und man sieht nur noch Kerne. Auch diese lösen sich allmählich anf bis nur noch ein kaum färbbares Gerinnsel übrig bleibt. Das Protoplasma der Vogelblntkörperchen scheint anßerordentlich wenig widerstandsfähig zu sein, gegen die Enzyme des Magensaftes, während sich die Kerne bedeutend resistenter verhalten. Letzteres gilt ebenso von den Parasiten. Diese überdauern mindestens stets den Zerfall des Protoplasmas der Blutkörperchen nnd nachdem sie dann frei geworden sind, überleben manche den Zerfall der Kerne. Es mag dahingestellt sein, ob die Parasiten, wenn sie mit den infizierten Blutkörperchen in den Magen gelangen vielleicht durch ihre eigene Giftwirkung mit dazu beitragen, daß die Blutkörperchen zerfallen oder aber ob das Blutkörperchen — was das wahrscheinlichere ist — eher der Wirkung des Magensaftes anheim fällt, jedenfalls sieht man wenige Minuten nach dem Saugakt im Magenblnt eine große Anzahl freier Parasiten. Vornehmlich weibliche und männliche Gameten, auch Teilungsstadien, auch zuweilen mehr oder weniger Jugendformen.

Am längsten halten sich jedenfalls die weiblichen Gameten. Genane Zeitangaben über die Resistenz der einzelnen Elemente lassen sich jedoch nicht geben, da der Zerfall von verschiedenen Faktoren abhängt, z. B. auch davon, ob bei noch nicht vollständigem verdauten Blut schon wieder Zuckerlösung genommen wird, dann

auch von der Lage der Blutkörperchen, ob sie am Rande des Magens oder in der Mitte der Blutmasse liegen. So fand ich z. B., um nur zwei Daten anzugeben, in einem Falle nach 48 Stunden, wo gewöhnlich schon das meiste verdant ist, die Kerne der Blutkörperchen kaum zerfallen und Teilungsformen noch vollständig intakt und ein anderes Mal bereits nach 20 Stunden fand ich nur Detritus und kaum mehr kenntliche Parasiten. Nach 56 Stunden Verdauung bei 27° sind gewöhnlich keine geformten Blutelemente mehr vorhanden, nur noch Perasitenstadien: eventuell Ookineten. Der übrige Mageninhalt besteht aus Magensaft, Detritus, Bakterien und hier und da Hefen.

Im Vergleich zu dem verdauten Blut im Stegomyiamagen ist, wie ich vielfach beobachten konnte, der Zerfall des Blutes im Magen von *Culex* ein bedeutend schnellerer. Nach 8 Stunden bereits sind intakte Parasiten nur noch sehr spärlich zu sehen, Blutkörperchen fast alle aufgelöst.

Ich übergehe hier die Beschreibung der Proteosomaparasiten in den Vogelblutkörperchen, da ich sie als allbekannt voraussetzen kann und verweise auf die der Arbeit beigegebenen Tafeln, wo auf Tab. IV Fig. 1—21 einige charakteristische Formen wiedergegeben sind. [1])

Fig. 1—3 repräsentieren die jüngsten Stadien der Infektion z. T. in neu entstandenen noch polychromatophil gefärbten Blutkörperchen. Fig. 6 zeigt die bekannte Verschiebung des Blutkörperchenkernes beim Heranwachsen der Parasiten. Nicht selten beobachtet man kernlose Blutkörperchen, welche infiziert sind, wie z. B. in Fig. 5, 7 und 21. Eine Eigentümlichkeit bei der Proteosomainfektion geben die Fig. 4, 8 und 9 wieder. Es ist das merkwürdige Festhalten der Parasiten am Kern, selbst wenn das Protoplasma des Blutkörperchens längst zugrunde gegangen ist. Neben einer unregelmäßigen Teilungsform in Fig. 7 und 8 sieht man in Fig. 10 eine „Gänseblümchenform“ die einem Quartanaparasiten entsprechen könnte. Auffällig sind die vielen kleinen Formen, die in ihrer normalen Größe kleiner als Gameten, aber größer als Merozoiten erscheinen, wie sie in Fig. 13, 14 und 15 dargestellt sind. Sie sehen aus wie Parasiten, die auf einem Zwergstandpunkt

[1]) Sämtliche Bilder auf Taf. IV u. V sind von Präparaten gezeichnet, die aus dem Mageninhalt von *Stegomyia fasciata* stammen und die Entwicklung der *Proteosoma*-Parasiten bis zur Bildung der Ookineten veranschaulichen. Färbung: Giemsa-Lösung. Vergr. 1000 : 1.

stehen geblieben sind, in ihrer Kleinheit aber auch bereits Teilung des Chromatins aufweisen können (Fig. 14 oben). Auch etwas größere Formen lassen sich nicht selten auffinden, wie Fig. 16, 17 nnd 18, wo es bis zu einer Vierteilnng des Chromatins gekommen ist. Ich habe aber bei diesen Formen nnr selten mit Sicherheit eine vollendete Teilung gesehen. Diese Parasiten sind es auch, welche bei der Verdauung des Blutes mit am raschesten zerfallen.

Eine Frage, die bei der Beobachtung solcher kleiner Parasiten zu beantworten bleibt ist die: Wie entstehen sie und wie kommen sie in die Blutflüssigkeit? Es kann zwei Wege geben: Entweder es entwickeln sich Merozoiten extraglobulär oder aber die Blutkörperchen zerfallen sehr zeitig und die jnngen Parasiten werden frei nnd rnnden sich ab. Für erstere Annahme fehlen die Anhaltspunkte. Wir kennen kein „echtes *Plasmodium*", bei dem die Schizogonie anßerhalb der roten Blutkörperchen verliefe. Dagegen dürfte die zweite Annahme die richtigere sein, denn wir sehen, daß das Protoplasma der roten Blutkörperchen im Magen der Mücke anßerordentlich schnell zerfallen kann, so daß die jungen Parasiten frei werden. Daß sie kaum größer werden, wie der ursprüngliche Zustand beim Zerfall der Blutkörperchen war, läßt sich leicht daraus erklären, daß ihnen das Hämoglobin zur Ernährung fehlt, und weil sie sich infolgedessen nicht weiter entwickeln können, so finden wir anch keine vollendeten Teilungsformen bei ihnen. Auch der leichte Zerfall dieser unfertigen Stadien ist somit leicht zu verstehen.

Entwicklnng der Microgameten aus den Microgametocyten und die Copulation der männlichen und weiblichen Gameten.

Hatte die *Stegomyia* an dem Kanarienvogel auf der Höhe seiner Infektion Blnt gesogen, so finden sich im Magen der Mücke zahlreiche freie Microgametocyten nnd Macrogameten (Macrogametocyten Lühe's) vor, die sich leicht im ungefärbten und gefärbten Präparat auffinden lassen. Beide Formen sind variabler an Größe nnd Farbenintensität wie die Gameten der menschlichen Malaria. Besonders schwanken die Größenverhältnisse, wie z. B. Fig. 28 und 29; ebenso Fig. 23 und 25 auf Tab. IV und z. B. Fig. 46 nnd 47 auf Tab. V beweisen. Anch ans den übrigen Bildern Fig. 22—29 ist die Variabilität in Form, Färbung und Granulierung zu entnehmen:

Die Beweglichkeit der Gameten, besonders der weiblichen, fand ich verhältnismäßig lebhaft, wobei jedoch eine Formverände-

rnng nicht zu beobachten war. Sehr augenfällig ist die starke Pigmentiernng der erwachsenen Gameten. Ich teile die Meinung anderer Antoren, wie SCHAUDINN, ZIEMANN und LÜHE, welche darin den Ansdruck für eine länger dauernde Wachstumsperiode sehen nnd schließen dies für die Proteosomaparasiten anch daraus, daß man innerhalb der Zeit, wo sich im Vogelblut bereits viele Parasiten in vollendeter Teilung befinden, zunächst nur jüngere Gameten in den Blutkörperchen antrifft. Bei Gameten dagegen gewöhnlich erst, wenn mehrere Generationen mit der Teilnng zn Ende sind. Die Beurteilung dieser Tatsache ist allerdings bei *Proteosoma*, weil im Blut alle Entwicklnngsstadien nebeneinander vorhanden sind, nicht ganz leicht, doch vermag man bei täglicher genaner Untersuchnng des Kanarienvogelblutes vom Beginn der Infektion an genügend Anhaltspunkte dafür zn gewinnen.

Während nun der Macrogamet sich in seinen Formen nicht oder nnr durch seine Kernreduktion verändert, entstehen alsbald wesentliche Umwandlungen im Inneren des Microgametocyten. Das Protoplasma verschwindet und an Stelle desselben sieht man im gefärbten Präparat eine reichliche Menge Chromatin anftreten, neben starker Pigmentgranulierung (Fig. 37 Tab. IV). Am Ende dieser Umwandlnng haben sich eine Anzahl dentlich unterscheidbare Kerne gebildet, bis zn acht, manchmal auch weniger, woranf die Anflösung des Microgametocyten nnd die Ausschwärmung des Microgameten vor sich geht. Ich habe Gelegenheit gehabt in zahlreichen Präparaten ans dem Magen der Mücken zn sehen, wie die Microgameten direkt ans dem Chromatin entstehen nnd sich herausentwickeln, nnd habe einzelne Typen in den Fig. 38—42 auf Tab. IV wiedergegeben. Es löst sich im gegebenen Angenblick die Membran des Parasiten und ein vorgebildeter Microgamet, der bereits an der Peripherie des Microgametocyten lag, trennt sich ab (Fig. 38 u. 39). Unter scheinbarer Auflockerung des ganzen Parasiten und des Chromatins lösen sich allmählich mehr Microgameten von dem Zentrum ab (Fig. 40), der Parasit wird durchsichtiger nnd schließlich schießen die spermatozoenähnlichen Gebilde nnter drehender Bewegung des Parasiten davon. Es macht den Eindruck, als ob die Parasiten gleichsam aufgerollt wären nnd abgewickelt würden. Besonders deutlich zeigt dies Fig. 42. Das Pigment wird bei der Auflösung der Parasiten mit herausgeschleudert nnd ist in solchen Präparaten, wo Microgametenbildung bereits stattgefunden hatte, vielfach als zitternde starkreflektierende Körnchen zu beobachten. Das „Geißeln“ d. h. das Schlagen nnd Hin- und Herpendeln der

Microgameten, was man im ungefärbten Präparat so schön beobachten kann ist offenbar der Ausdruck dafür, daß die Microgameten sich aus der Verbindung loszureißen versuchen. Man beobachtet zwei, drei und mehrere „Geißeln“ (Fig. 30—33) im ungefärbten Präparat. Die Form der alten Microgametocyten ist fast immer rund, einmal (Fig. 33) sah ich den Parasiten länglich, aber vielleicht ist dieses eine Form gewesen, die schon vor der völligen Auflösung stand. Ihre Bewegung war gleich Null.

Um die „geißelnden“ Stadien so natürlich wie möglich auch im gefärbten Präparat zu bekommen, sind alle diese Präparate mit Osmiumsäuredämpfen fixiert worden. Die „Abwicklung“ der Microgameten geht selbstverständlich nach allen Seiten hin vor sich; sobald die frischen Präparate aber fixiert werden, sieht man die Microgameten auf einer Fläche ausgebreitet.

Ich habe diese Art der Microgametenentwicklung noch nicht beschrieben gefunden, ob sie beobachtet ist, weiß ich nicht. Jedenfalls ist mir in der mir zugänglichen Malarialiteratur und Proteosomaliteratur nichts derartiges aufgestoßen. Diese bei *Proteosoma* im Magen der Stechmücke gefundene Enstehung der Microgameten direkt aus dem Chromatin stellt ein ganz analoges Verhalten dar, wie es Sacharoff [1]) bei der „Krähenmalaria“ (den Photogrammen entsprechend wohl *Halteridium*) beschrieben hat; daß nämlich „die Geißeln nichts anderes sind als die aus den Zellen austretenden Chromatinfäden“. Das Kernchromatin besitzt nach Sacharoff bald ovale oder rundliche Form, bald Kerne aus Chromatinfäden bestehend, bald hat der Kern Ausläufer, bald besteht er aus unregelmäßigen Körpern, „die durch einige Fäden“ vereinigt sind. Es teilt sich der Kern durch Caryokinese und die an beiden Polen entstandenen Chromosomen treten später aus dem Parasiten heraus. Sacharoff sah auch, wie dieselben das Blutkörperchen, in dem der Parasit saß, durchbohrte. Das habe ich aber nicht beobachten können.

Die freien Microgameten pendeln mit schlagenden Bewegungen zunächst in der Nähe des Ursprunges eilig hin und her, bis sie aus dem Gesichtsfeld verschwinden. Sie erscheinen ungefärbt nur als glatte Fäden, im gefärbten Zustande dagegen sieht man an ihnen einen dünneren und einen dickeren kolbig angeschwollenen Teil, welcher an seinem stärkeren Ende oft noch eine birnförmige bis

---

[1]) Sacharoff: Über die selbständige Bewegung der Chromosomen bei Malariaparasiten. Centralbl. f. Bakteriol. Bd. 18 p. 376.

kugelige Anschwellung zeigt (Fig. 43, Tab. IV). Die Formen sind aber auch variabel. Wegen ihrer eigentümlichen Bildung fallen sie besonders auf und zeigen damit anch einen anderen Bau, wie etwa die Microgameten der menschlichen Malaria (vgl. die Abbildungen der gefärbten Microgametenpräparate bei Ziemann in Mense, Handb. d. Tropenkd. III). Mitunter konnte ich verzweigte oder geteilte Microgameten beobachten (Fig. 44 Tab. IV). Auch hierüber habe ich nichts Analoges in der Literatur finden können, falls man nicht die unregelmäßig verzweigten Körper von Sacharoff, aus denen das Chromatin bestand und aus dem die „Geißeln" hervorgingen, in einem gewissen Zusammenhang bringen will. Es müßte dann freilich angenommen werden, daß das Chromatin auch nach seiner Abschnürung als Microgamet sich teilen könnte.

Zieht man die Länge der geißelnden Fäden aus Microgametocyten in Vergleich mit den gefärbten „Geißeln" (Microgameten), so besteht eine erhebliche Differenz. Die ungefärbten Fäden sind viel länger als die gefärbten. Die Erklärung dafür sucht Sacharoff, der ähnliches auch bei seiner Krähenmalaria gefunden hat, darin, daß die austretenden Microgameten mit einer mit Romanowsky-Farbe nicht färbbaren „achromatischen Fibrille" verbunden sind, die den eigentlichen Microgameten qnasi verlängert. Beim Färben ist dann erst die eigentliche Größe desselben sichtbar.

Die Microgameten treten nicht alle zu gleicher Zeit und nicht alle in einem bestimmten Zeitintervall ans; es kommen im Gegenteil recht große Verschiedenheiten vor. Die Parasiten znm Austritt zu bewegen, gelingt bekanntlich bei *Proteosoma* schon, wenn man infiziertes Kanarievogelblut auf den Objektträger bringt. Schneller nnd mit Beteiligung einer größeren Anzahl Microgametocyten geht das Ansschlüpfen aber im Magen der Mücke vor sich. So fand Ross, daß in vitro bei *Plasmodium immaculatum* 5 Proz. der Halbmonde „Geißeln" anssandten, während im Magen von *Anopheles* 60 Proz. Microgameten bildeten. Ähnliche Verhältnisse findet man bei *Proteosoma* nnd im *Stegomyia*-Magen.

Falls im Gesichtsfeld 30—40 Microgametocyten liegen, beobachtet man etwa 1—3, welche Mirogameten aussenden. Die übrigen, welche nicht zur „Geißelbildnng" geeignet sind, gehen sehr bald zugrunde.

Das Hervortreten der Microgameten spielt sich meist in der Zeit von $^1/_2$—1 Stunde nach dem Saugakt der Mücke ab. Ich habe aber auch vielfach bei Mücken, die nach weniger als 10 Minuten nach dem Sangakt seziert werden und nach sofortigem Untersnchen

im hängenden Tropfen bereits Geißelbewegungen gesehen. Andererseits war ich überrascht noch in einem Falle 16 Stnnden nach dem Sangen, bei Untersuchung des Mückenblutes frisch austretende nnd um sich schlagende Microgameten zn beobachten.

Die Bewegungen können ziemlich lange anhalten; ich konnte sie im hängenden Tropfen bis zn 4 Stnnden verfolgen, meistens geißelten die Parasiten $^1/_2$—$^3/_4$ Stnnden nnd zwar fast immer in rhythmischer Bewegung, so, daß 10—26 Sekunden lang znckende Bewegnngen vor sich gehen nnd daranf eine 5—12 Sekunden danernde Rnhepanse eintritt. Manche Microgameten schlagen ohne Ruhepanse bis zn 6 Minuten, um dann fast ebensolange ihr Pendeln zu sistieren. Es kommen aber auch andere Rhythmen vor. Die Rnhepausen werden allmählich immer länger, die Arbeitszeiträume immer kürzer, bis die Fäden ihre Bewegungen ganz einstellen. Diese rhythmischen Bewegungen sieht man besonders dentlich, wenn die Fäden irgendwo festsitzen oder eingeklemmt sind. Handelt es sich nm eben ans dem Microgametocyten hervortretende Geißeln, so tritt diese Erscheinung nicht so auffällig zntage, jedenfalls nicht bis zu der Zeit, wo sie sich ganz abgeschnürt haben, auch „geißeln", nicht alle heransgetretenen Microgameten anf einmal, sondern abwechselnd.

Angelockt von den Macrogameten, deren rollende Bewegung nm diese Zeit (meist $^1/_2$—1 $^1/_2$ Stnnde nach dem Saugen der Mücke) manchmal eine recht lebhafte ist, schlängeln sie eifrig um diese herum, bis sie an sie herangekommen sind (Fig. 49 Tab. V). Man sieht dann gelegentlich ziemlich schnell einen Microgameten in den Macrogameten verschwinden (Fig. 50. 51 Tab. V nnd 45. 46. 47), wobei meist die den Microgameten aufnehmende Stelle vorgewölbt erscheint (Fig. 45 Tab. V).

Es widerspricht wohl zwar der allgemeinen Auffassung nnd Schaudinn hat auch erwähnt, daß nach der erfolgten Copulation kein weiterer Microgamet mehr eindränge, doch möchte ich nach meinen Beobachtungen fast glauben, daß dies unter Umständen möglich ist. Ich habe einige Male (Fig. 49 gibt darüber Aufschluß) mit dentlicher Sicherheit das Verschwinden von zwei Microgameten in den Macrogameten beobachten können. Ein Versehen war nahezu ausgeschlossen, da im Präparat der Macrogamet ganz isoliert lag und die Schicht des Präparates war anch so dünn, daß die Microgameten in allen ihren Bewegungen außerordentlich gut verfolgt werden konnten. Die Eiwanderung des einen und des zweiten spielte sich in einem Zeitraum von 6 Minuten ab. Die Bewegungen des vorher stark zitternden nnd teilweise rollenden Macrogameten

hörten dann auf. Zwei andere Microgameten schienen später an dem Macrogameten fest zu kleben, verfielen bald in die oben besprochene rhythmische Bewegung, bis sie nach ca. 15 Minuten regungslos werden. Bestätigt schien mir die im lebenden Präparat gemachte Beobachtung dnrch ein Präparat, welches mit Osmium fixiert war (Fig. 49). Dort sah man ebenfalls zwei Microgameten in den Macrogameten verschwinden, während ein dritter in pendelnder Bewegung in nächster Nähe des Macrogameten fixiert wnrde. Fig. 47 zeigt einen Macrogameten, an dem zwei früher pendelnde Microgameten zur Rnhe gekommen sind, während von einem, welcher in den weiblichen Gameten verschwand, nur noch ein Rest zu sehen ist.

Finden die Microgameten keinen Eingang in den Macrogameten und können sie so ihr Ziel und ihre Bestimmung nicht erreichen, so sind sie nach kurzer Zeit dem Zerfall preisgegeben. Nachdem die Bewegungen z. T. aufgehört haben, sieht man, wie die anfangs glatten Fäden körnelig werden, ihre rhythmischen Bewegungen hören später ganz anf und der alsdann sehr bald anfgelöste Faden verschwindet aus dem Gesichtsfeld. Vielfach scheint als Zeichen der Degeneration eine Art Agglomeration der zwecklosen Geißeln herbeigeführt zu werden, so daß man nicht selten viele Fäden verschlnngen zusammen findet (vgl. Fig. 34. 35. 36 Tab. IV). Kurze, an feinste Streptokokken erinnernde körnelige Fäden sind um diesen Zeitpunkt fast in jedem Gesichtsfeld vorhanden. Farbe scheinen sie nicht mehr auznnehmen.

Die ganze Copnlation verläuft innerhalb einer Zeit von ca. 1—2 Stunden. Man sieht auch hier Verschiedenheiten auftreten, da man das Eindringen von Microgameten in den weiblichen Gameten, ähnlich wie das Ausschwärmen der Microgameten, bereits wenige Minuten nachdem die Mücke Blut gesogen hat bis mehrere Stnnden später beobachten kann. Koch erwähnt bei *Halteridium*, daß die Copulation bereits in 10—20 Minnten vollendet sein kann. Ruge fand im *Anopheles*-Magen den Befruchtungsgang in 20 Minuten bis 2 Stunden vollzogen.

Es ist schon viel diskutiert worden über das Reiz auslösende Moment, durch welches die Microgameten frei werden und die Befruchtnng zustande kommt. Während Danilewsky und Schaudinn und anch Claus [1]) der Meinung sind, daß besonders die

[1]) Lühe: Mense l. c. p. 235 bringt eine zusammenfassende Übersicht über diese Frage, der ich die Daten entnehme.

Abkühlung der Parasiten, sobald sie aus dem Vogelblutkörper herauskommen, dabei von der größten Bedeutung sind, neigen Ross, Doflin und Lühe der Meinung zu, daß vielmehr die Veränderung der Dichtigkeit des Blutes den wesentlichen Einfluß ausübe. Für beide Anschauungen sind zahlenmäßige Belege vorhanden, die im einzelnen bei Lühe niedergelegt sind. So beobachtete Claus, der sich auf Grund seiner Experimente mit *Halteridium* für die Temperaturerniedrigung (wenigstens soweit es die Microgameten und Ookinetenbildung angeht) aussprach, daß bei 35° die Microgametenbildung ausblieb. Senkte er die Temperatur auf 19,5°, so trat sie nach 40—60 Sekunden ein. Bei 18,5° traten die Geißeln nach 1—3 Minuten, bei 17° nach $1^1/_2$—2 aber nur vereinzelt und bei 7° gar nicht mehr aus.

Andererseits wiederholte er die von Ross mit Perniciosa ausgeführten Versuche über die Wirkung des künstlichen Blutes und die Wirkung von Luftabschluß oder Luftzutritt auf den Verlauf des Befruchtungsaktes mit *Halteridium* und kam zu übereinstimmenden Resultaten mit Ross, so daß die von Lühe früher schon ausgesprochene Vermutung von dem Einfluß der Dichtigkeitsveränderung des Blutes eine besondere Stütze fand.

Das Wesentlichste bei den Ross'schen Malariaversuchen ist die Beobachtung, daß ein Zusatz von Wasser, je nach der Menge das Heraustreten der Microgameten fördert und daß ebenfalls der Zutritt von Luft den Verlauf beschleunigt.

Ich habe nun in dieser Richtung mit proteosomahaltigem Vogelblut ganz ähnliche Versuche wie Ross und Claus angestellt und bin auch zu ganz ähnlichen Resultaten gekommen. Im ganzen verliefen aber die Phasen der Entwicklung langsam. Da Ookinetenbildung bei *Proteosoma* auf dem Objektträger nicht stattfindet — ich habe wenigstens gleich wie auch Koch und Ruge nie etwas davon gesehen —, so konnte nur die Microgametenbildung beobachtet werden.

Ich wählte Temperaturen von 37°, 27°, 22° und 8°, benützte unverdünntes Blut, Blut mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit gewöhnlichem Wasser verdünnt. Die Menge des Wassers betrug einmal das Fünffache der verwandten Blutmenge, das andere Mal nur etwa $^1/_5$ der verwandten Blutmenge.

Folgende kleine Tabelle gibt über die Resultate Aufschluß:

Das Austreten von Microgameten wurde beobachtet nach Verlanf von

Bei einer Temperatur von	Mit unverdünntem Blut	Verdünnt mit dem 5. Teil NaCl-Lösnng	Verdünnt mit der 5 fachen Menge NaCl-Lösnng	Verdünnt mit dem 5. Teil gew. Wasser	Verdünnt mit der 5 fachen Menge gew. Wasser
37°	Blieb ans	Blieb aus	Blieb ans	Nur einmal eine einzige Geißel beobachtet	Blieb ans
27°	Vereinzelte Geißeln nach 15 Min.	Mehrere Geißeln nach 10 Min.	Ganz vereinzelte Geißeln nach 24—25 Min.	Reichliche Geißeln nach 2—3 Min.	Blieb aus
22°	Wenige Geißeln nach 12—13 Min.	Viele Geißeln nach 10 Min.	Vereinzelte Geißeln nach 20 Min.	Vereinzelte Geißeln nach wenigen Sekunden, zahlreich nach 1—2 Min.	Vereinzelte Geißeln in 12—13 Min.
8°	Blieb aus	Blieb ans	Blieb aus	Blieb die ersten 5 Min. ans, später ganz vereinzete Geißeln	Blieb ans

Hieraus ist zu entnehmen, daß gewöhnliches Wasser in sehr kleinen Mengen (etwa $^1/_5$ der Menge des Blutes) dem parasitenhaltigen Blut zugesetzt den größten Reiz ansübt. Nimmt man sehr viel Wasser (das 10 fache des vorherzugesetzten), so tritt die Reaktion nur langsam und spärlich anf, oder sie bleibt ganz aus. Physiologische Kochsalzlösung in kleinen Mengen hat keinen wesentlichen Einfluß auf den Austritt der Microgameten. Der Erfolg ist nur etwas besser als wie bei unverdünntem Blut.[1]) Größere Mengen verzögern die Entwicklung. Die Temperaturunterschiede von 27°—22° sind nicht von sehr einschneidender Bedeutung, wenn auch bei 22° die Entwicklung etwas lebhafter vor sich geht. Temperaturen von 37° und 8° scheinen im allgemeinen ungeeignet zu sein; nur bei einer Verdünnnng mit wenig gewöhnlichem Wasser zeigten sich ganz spärliche Geißeln.

Ganz dieselben Versuche, bei Luftabschluß ausgeführt, brachten mich zn der Überzeugung, daß der freie Zntritt von Luft

[1]) Ross l. c. sagt p. 24 in seiner Arbeit, daß sich die Geißeln, so lange das Blut unverdünnt ist, überhaupt nicht ablösen. Hier scheint also zwischen Perniciosa und der von mir verwendeten Proteosoma ein Unterschied zu bestehen.

zu dem Blut wohl einen Einfluß in günstigem Sinne hat, aber doch nicht von ausschlaggebender Bedeutnng sein kann. Die Unterschiede waren so klein, daß ich es für überflüssig halte sie hier im einzelnen wiederzugeben. Ich neige nach den gemachten Beobachtungen vielmehr der Ansicht zu, daß osmotische Einflüsse bei dem Austreten der Geißeln bei weitem die wichtigste Rolle spielen, was sich sehr deutlich im Parallelversuch mit Kochsalzlösung und gewöhnlichem Wasser ausspricht. Da das gewöhnliche Wasser ja auch hämolytisch wirkte, so kann man eine anregende Wirkung auf den Parasiten auch ohne weiteres verstehen.

Wie ist aber der Austritt der Geißeln im Magen der Mücke zu erklären?

Zunächst erinnere ich daran, daß im Stegomyiamagen die Microgameten bei der gewöhnlich von mir geübten Methodik[1]) im allgemeinen viel später austraten als bei der Untersuchung des direkten Blutes vom infizierten Vogel. Im Mittel fand ich den Austritt $^1/_2$—1 Stnnde nach dem Saugakt, freilich auch in manchen Fällen nach weniger als 10 Minuten, in einem Falle aber erst 16 Stunden nach dem Saugen.

Die Temperaturunterschiede können auch für diese Verzögerung nicht allein verantwortlich gemacht werden, da ich in speziell darauf gerichteten Versnchen, bei denen Mücken vor und nach dem Saugen sowohl bei 22° als auch bei 27° gehalten und seziert wurden, nngefähr dieselben Resultate erhielt. Es bleibt also als wirksames stimulierendes Agens nnr die Magenflüssigkeit übrig. Daß sie ein anreizendes Liquidum ist, sehen wir daran, daß das Protoplasma der Blntkörperchen nnd später anch die Kerne, endlich auch die Parasiten angegriffen nnd verdaut werden. Warum sollen nicht anch die freien Microgametocyten eine Stimnlation zur Aussendnng ihrer Geißeln erfahren? Die Magenflüssigkeit, vielleicht auch vom Mageu gebildetes Enzym, wirkt aber schonender als gewöhnliches Wasser und deshalb dauert der Entwicklungsprozeß der Microgameten im Magen der Mücke länger als wenn das Blut im Objektträgerpräparat direkt nntersucht wird.

Nach all diesen Beobachtungen möchte ich mit Nachdruck

---

[1]) Die Mücken, welche gesogen hatten, waren bei 27° gehalten. Znr Untersuchnng werden sie in demselben Raum chloroformiert, in einem Nebenraum von 20—22° (Zimmertemperatnr) gebracht, seziert und der Mageninhalt untersucht, nachdem derselbe mit einer Spur physiologischer Kochsalzlösnng verdünnt war. Letztere hatte, wie wir eben ans der Tabelle ersahen, keinen wesentlichen Einfluß auf die Beschleunigung des Geißelaustrittes.

mich — wie es Lühe ja schon ausgesprochen hat — der Ansicht zuneigen, daß die Aussendung von Microgameten in erster Linie abhängig ist und ausgelöst wird von „der Veränderung der Dichtigkeit des Blutes“. Die Temperaturunterschiede dürften erst in zweiter Linie in Betracht kommen. Vielleicht wirken im Magen der Mücke stimulierende Enzyme mit.

Die Bildung der Ookineten.

Nachdem die Microgameten sich mit den Macrogameten vereinigt haben, entsteht zunächst ein rundes oder gelegentlich auch längliches Gebilde (Fig. 53—56), in welchen man neben einem dichten blauen Protoplasma auch eine Menge Chromatin vorfindet. Dies stammt z. T. von dem aufgenommenen Microgamet. Bei gut gelungener Färbung kann man deutlich einen größeren und kleineren Kern unterscheiden, welche Schaudinn als die Kerne des Macro- und Microgameten auffaßt, die noch nicht verschmolzen sind. Im ungefärbten Präparat zeigen sich die neu entstandenen Ookineten als rundliche Gebilde mit stark reflektierendem Pigment, welches zuweilen außerordentlich großkörnelig ist. Die frühere Bewegung der Macrogameten hat aufgehört.

Zur Illustration der Frage, die bereits oben berührt wurde, ob mehr als ein Microgamet in den Macrogameten eindringen kann, verweise ich auf Tab. V Fig. 57. Es ist das Bild wohl nicht anders zu deuten, als daß eine Überfruchtung von zwei Microgameten stattgefunden hat. Die Form selbst dürfte ein allerjüngstes Ookinetenstadium darstellen, indem die Kerne noch nicht aneinander gerückt sind. Die Entstehung der Ookineten schließt sich auch an die Copulation an und man müßte dieselben, falls man ihre jüngsten Stadien immer ohne weiteres von den noch vorhandenen Macrogameten unterscheiden könnte, sie in jedem Präparat eruieren und die Zeit ihres Anfangs festlegen können. Es ist dies aber leider nicht der Fall. Wir vermögen die Ookineten als solche meist erst genau zu erkennen, wenn sie ihre charakteristische Form angenommen haben oder wenigstens im Begriff sind, sie anzunehmen. Dies wird erleichtert dadurch, daß unterdessen die übrigen Elemente, Blutkörperchen und Parasitenzellen absterben, zu Detritus zerfallen und sich nicht mehr färben lassen resp. eine homogene Masse bilden, aus der sich die Ookineten färberisch oder durch ihre Konturen abheben. Es ist eine biologische Merkwürdigkeit, daß die neugeborenen Ookineten, die aus nichts anderem bestehen, als aus

Protoplasma und Chromatin wie die weiblichen und männlichen Gameten, der auflösenden Kraft des Magensaftes trotzen können und weiter gedeihen, während alle anderen Parasitenphasen, die übrig blieben, in derselben Zeit zugrunde gehen.

Die Zahl der entstehenden Ookineten kann aus der Zahl der vorhandenen Macrogameten und Microgametocyten nicht mit Bestimmtheit vorausgesagt werden. Es copulieren jedenfalls nur ein beschränkter Teil der letzteren und zwar verhältnismäßig wenig. Bei den einzelnen Parasiten und verschiedenen Mücken ist es durchaus verschieden. So findet man sie bei *Proteosoma* im *Culex*-Magen stets ziemlich reichlich vor, im *Stegomyia*-Magen stets sehr spärlich. Dabei ist es ziemlich gleichgültig, ob man die Mücken bei 22° oder bei 27° hält. Ich vermute, daß hier doch auch die Verdauungssäfte bei den einzelnen Arten Mücken eine wichtige Rolle spielen, die das Aufleben der eben entstandenen Ookineten und die Weiterentwicklung möglicherweise verhindern.

Der Zeit nach beobachtete ich bereits die ersten Ookineten in ihren Anfangsstadien, wie sie in Fig. 58—62 Tab. V wiedergegeben sind, gewöhnlich nach 10—16 Stunden nach dem Saugakt, in ganz seltenen Fällen bereits nach 6 Stunden. Das Wachstum schreitet rasch vorwärts, so daß man bis zu 20 Stunden Formen wie in Fig. 63—67 vorfinden kann, d. h. der früher runde, später etwas verzogene Parasit fängt an nach einer Seite hin das Protoplasma vorzustrecken und sich allmählich zur Retortenform (Fig. 68 bis 71) auszuwachsen.

Letztere Formen werden gelegentlich schon nach 16 Stunden hier und da angetroffen, die Hauptmengen dagegen zeigen sich nach cr. 26 Stunden. In dieser Zeit habe ich wenigstens im *Stegomyia*-Magen die Entwicklung und weitere Entstehung der Ookineten am lebhaftesten gefunden.

Die sogenannten Retortenformen zeigen gelegentlich sehr eigentümliche Gestalt und erscheinen besonders groß (Fig. 71), nehmen aber bei der späteren Streckung sehr bald wieder eine gedrängte Form an. Die nächstfolgende Phase ist die der gekrümmten „Würmchen“ (Fig. 77—80). Hier sind die Ookineten auf dem Höhepunkt ihres Wachstums angelangt, welches im allgemeinen in die Zeit von 50—64 Stunden fällt. Die gekrümmten Formen werden später immer rarer, es machen ihnen die gestreckten Platz (Fig. 72 bis 75), die ich bis zu 72 Stunden lebend angetroffen habe. Sie sind es, welche weiter in die Magenwandung vordringen und die Cystenbildungen veranlassen. Untersucht man sorgfältig noch

länger die Mägen der Stegomyien, so trifft man nach 75 Stunden nur noch Ookineten an, die ihren Zweck nicht erfüllen konnten und dem nunmehrigen Zerfall preisgegeben sind. Sie werden zum Teil rundlicher, das Protoplasma löst sich anf, es treten bizarre Verschiebnngen in der Form auf, es läßt sich nur noch schlecht färben, auch das Chromatin, welches noch wenige Stunden vorher hellrot anfleuchtete, verliert seinen Glanz, bis endlich nnr noch ein Schatten des Parasiten zurückbleibt (vgl. Fig. 81—92 Tab. V). Der vollständige Zerfall geht mit der Anflösung der letzten Spur Blut im Magen der Mücke parallel. Da die weiter zu untersuchenden Mücken wieder anstatt Blnt Zuckerlösnng bekamen, so fand man später im Mageninhalt nichts mehr, was auf die Anwesenheit so großer Mengen parasitenhaltigen Blutes schließen ließ.

Dies ist der allgemeine regelmäßige Entwicklungsgang der Ookineten im Stegomyiamagen. Hiervon beobachtet man auch allerlei Abweichungen. Ich habe z. B., während sich schon nach 36 Stunden fast reife gebogene Formen und viele Retortenformen vorfanden, noch Copnlation beobachtet. Die darans entstehenden jungen Formen kommen naturgemäß sehr spät zur endgültigen Entwicklnng, so daß diese Formen erst gegen die 70. Stunde den Höhepunkt ihrer Ausbildung erreicht haben. Audererseits sah ich gelegentlich schon nach 26—30 Stunden die ersten Zerfallsformen, welche wahrscheinlich Überreste einiger weuiger schon nach 16 bis 20 Stunden vollendeten reifen Ookineten geweseu sind. Bis zur 60.—64. Stnnde sieht man noch alle Formen von der Retorte bis zur gestreckten Form, dann gehen sie nach ihrer Streckung ihrer weiteren Bestimmung entgegen oder zerfallen.

Aus diesen Beobachtungeu geht hervor, daß im *Stegomyia*-Magen die Ookinetenbildung im allgemeinen langsam vor sich geht. Vor allen Dingen ist, wie ich anderen Autoren entnehme, die Entwicklnng der Ookineten von *Halteridium* eine bedentend schnellere. So beschreibt Koch, daß die Halteridiumookineten auf dem Objektträger sich in 30—45 Minuten! gebildet hätten; auch Claus berichtet in den obengenannten Versuchen, daß die Ookinetenbildung kaum über 1 Stunde hinans gedanert hätte.

Weitere Untersnchnngen über die Ookinetenbildnng bei *Proteosoma* im Magen von *Culex pipiens* resp. *Culex nemorosus* zeigten ähnlich wie bei meinen Versuchen mit Stegomyien eine Verlangsamung gegenüber dem *Halteridium*, aber doch eine gewisse Beschleunigung gegenüber den Ookineten im Stegomyiamagen. Koch fand bei *Proteosoma* im Magen von *Culex nemorosus* Ookineten nach

12—15 Stunden, welche aber nach 48 Stunden sämtlich verschwunden waren. Auch Ruge fand bei *Culex pipiens* nach 48 Stunden keine Ookineten mehr vor und Grassi sah die Ookineten der menschlichen Malaria bei *Anopheles* von der 12. Stunde an, die bis zur 40. Stunde zu verfolgen waren. Für *Proteosoma* im Culexmagen kann ich die Beobachtungen von Koch und Ruge bestätigen.

Die hier beschriebenen Resultate sind gewonnen bei der Aufbewahrung der Stegomyien bei 27°. Bleiben dieselben nach dem Stechakt einer kühleren Temperatur ausgesetzt, so verlangsamt sich die Ookinetenbildung. So fand ich bei diesen hierauf gerichteten Untersuchungen, daß bei Aufbewahrung bei 22°, Ookineten noch am 4. Tage angetroffen wurden, während sich der Anfang der Ookinetenbildung vor 25—30 Stunden nie konstatieren ließ; in der Regel fiel die Reife der an sich viel spärlicheren Ookineten in die Zeit von 70—75 Stunden.

Diese Beobachtung scheint mir insofern interessant, als sie zum erstenmal deutlich zeigt, daß die Temperaturerniedrigung eine Hemmung für die Entwicklung der Spätformen der Parasiten bildet. Für die Aussendung der Microgameten aus den männlichen Gameten schien sie ja, wenigstens in den Intervallen von 27°—22° nicht von wesentlicher Bedeutung zu sein. Bei der Ookinetenbildung kommen diese Differenzen schon in Betracht und bei der Cystenbildung fallen sie noch mehr ins Auge.

Eine Frage, die noch bei den Ookineten zur Diskussion steht ist die, ob es sexuell verschiedene Formen gibt. Schaudinn hatte bei seinen *Halteridium*-Studien in der *Athene noctua*, indifferente, männliche und weibliche sehen wollen. Betrachtet man die Reihe der Abbildungen von Fig. 59—80 auf Tab. V, so wird man sich des Eindruckes nicht erwehren können, daß hier Formen vorliegen, die — besonders die gekrümmten Ookineten (Fig. 72—80) — mit männlichen und weiblichen Halbmonden eine gewisse Ähnlichkeit haben. Das soll nur soviel sagen, daß in dem einen Falle dunkelgefärbte Parasiten vorhanden sind, mit dichtem violettblauen Protoplasma, einem kompakten Chromatinkern in der Mitte und das grobkörnige Pigment um den Kern herumgelagert z. B. Fig. 74. 75. 78. 79. 70 und außerdem finden sich Typen mit hellem durchsichtigeren Protoplasma, verstreutem Chromatin und weit verteiltem Pigment, ganz ähnlich den männlichen Geschlechtsformen der Gameten z. B. Fig. 68. 73. 76. 80.

Wenn auch meine Beobachtungen dafür zu sprechen scheinen, daß in der Tat männliche und weibliche Ookinten vorliegen, so hält

es doch schwer den Zweck dieser Formen ohne weiteres einsehen zn können, wenn man nicht etwa annehmen will, daß die Cysten Prodnkte der Vereinigung der sexuell getrennten Formen sind.

Die Cystenentwicklung im Magen der Stegomyia.

Über die Art der Einwanderung der Ookineten in die Magenwandung nnd die Anfänge der Cystenbildnng besteht noch nicht völlige Klarheit. Bekannt ist, daß der Ookinet durch das Magenepithel wandert, um sich in der Tnnica elasticomuscularis festznsetzen. SCHAUDINN nimmt an, daß der Parasit wirklich in die Epithelzelle eintritt, dort längere Zeit verweilt und dann erst zur Tunica elasticomnscnlaris vordringt. LÜHE dagegen glanbt an einen Durchtritt der Parasiten zwischen den Epithelzellen. GRASSI ist noch anderer Meinung. Aus der Meinungsverschiedenheit dieser so kompetenten Forscher geht schon hervor, daß die Betrachtnng dieser Entwicklungsphase mit ziemlichen Schwierigkeiten verknüpft ist nnd noch manche Unsicherheit besteht.

Soweit meine Beobachtungen bei *Proteosoma* im Magen der *Stegomyia* und bei *Culex* einen Schluß zulassen, so möchte ich mich eher der Meinung LÜHE's anschließen. Ich habe bei den vielen Präparaten bei der Untersuchnng auf Ookineten stets sorgfältig die Magenwandungen abgesncht, ohne anch nur einmal in der Epithelzelle einen Ookineten zu sehen. Der Durchtritt zwischen den Epithelzellen kann aber auch nicht lange währen, denn die wenigen Male, wo ich Ookineten so gelagert fand, daß man ein derartiges Durchdringen annehmen mußte, scheinen für die Schnelligkeit des Durchganges zu sprechen.

Sollte es sich bewahrheiten, daß es männliche nnd weibliche Ookineten gebe, — von indifferenten Formen SCHAUDINN's habe ich im Stegomyiamagen nichts Sicheres sehen können, — so würde man noch zn entscheiden haben, ob beide Formen oder welche von beiden befähigt wäre, sich direkt in die Cyste umwandeln zu können. Besonders diese Metamorphose scheint mir nach allem, was ich darüber fand, noch nicht genügend klar gestellt zu sein. Es wäre ja schließlich — falls die Anschauung von männlichen und weiblichen Ookineten anfrecht zu erhalten ist — immerhin möglich, daß ein Verschmelzungsprodnkt der sexnellen Formen in der Tunica elasticomuscularis erst den Ursprung der jungen Cyste abgibt.

Die ersten Anfänge der Cystenbildung sind schon ziemlich zeitig zu beobachten. RUGE sah bei *Culex Proteosoma*-Cysten bei

24—30° nach 2—3 Tagen. Ross fand sie nach 30 Stunden und Grassi bei *Anopheles* die Malariacysten bereits vor 40 Stunden. Ich kann für *Proteosoma*-Cysten bei *Culex* die Angaben Ruge's und Ross' bestätigen, dagegen liegen die Verhältnisse bei *Stegomyia* anders. Vor dem 3. Tage ist es mir nie gelungen Cysten zu finden, auch am 4. Tage nur sehr vereinzelt und erst am 5.—6. Tage sah man sie deutlich hervortreten. Dieser Unterschied in der Entwicklungsdauer der Cysten bei *Stegomyia* und *Culex* ist ein Analogon zur Verzögerung der Ookinetenbildung bei *Stegomyia* gegenüber *Culex* und *Anopheles*.

Läßt man die Mücken bei 27° saugen und bringt sie dann in eine Temperatur von 22° oder läßt man sie bei 22° saugen und behält diese Temperatur bei, so wird ganz ähnlich wie bei der Ookinetenbildung die Heranreifung der Cysten stark verzögert. Die Verlangsamung läßt sich z. B. durch die Angabe kennzeichnen, daß Cysten, die bei 27° am 4. Tage sichtbar sind, bei 22° erst am 8. Tage gesehen werden können. Auch Ruge[1]) berichtet für *Proteosoma* bei *Culex* ganz Ähnliches. Am 7. Tage waren die Cysten bei 20° erst so groß wie ein rotes Blutkörperchen. Es scheint auch die relative Feuchtigkeit der Luft, in der die Stegomyien gehalten werden, einen gewissen Einfluß auf die Heranreifung der Cysten zu haben. Für gewöhnlich betrug bei meinen Versuchen die relative Feuchtigkeit im Raum mit 27° C etwa 75—80°, da reichlich Wasser verdunstet wurde. Ließ ich in speziellen Versuchen die Feuchtigkeit der Luft auf etwa 40% heruntergehen, so dauerte die Entwicklung noch länger. So konnte ich in den Fällen, in denen bei 27° und 75% relativer Feuchtigkeit die Cysten am 3. Tage zu sehen waren, dieselben bei 40% Feuchtigkeit erst am 5. Tage beobachten.

Wenn es berechtigt ist aus diesen Beobachtungen einen Schluß auf die praktischen Verhältnisse zu ziehen, so würde man anzunehmen haben, daß in Regenzeiten in den Tropen bei der hohen relativen Feuchtigkeit eine größere Gefahr der Übertragung von Parasiten durch Stechmücken vorhanden ist, weil die Parasiten schneller und damit reichlicher entwickelt werden, als in den trocknen Zeitperioden.

Die jüngsten Stadien sind wegen der optischen Indifferenz gegenüber den gleich hellen Epithelzellen nicht ganz leicht zu sehen. Als charakteristisches Merkmal dient das Pigment, welches stark

[1]) Ruge: Untersuchungen über das deutsche Proteosoma. Centralbl. f. Bakteriol. I Bd. 29 Nr. 5.

lichtbrechend zunächst als winzige Körnchen zn beobachten ist. Sonst sind diese Zellen kaum von der Umgebung zu unterscheiden (vgl. Tab. VI Fig. 94 kleinste Cyste). In dieser ersten Größe habe ich die Cysten zn 24 μ messen können. GRASSI beobachtete bei den jüngsten Malariaparasiten einen Durchmesser von 30 μ.

Die Entwicklung geht nnn verhältnismäßig rasch vorwärts. Die Cyste hebt sich nach mehreren Stunden von der Umgebnng mehr hervor, das Pigment wird zahlreicher (Fig. 94 anf Tab. V obere Cyste), scheint jedoch später zn verschwinden; jedenfalls ist es an der Oberfläche der Cysten nicht mehr leicht sichtbar. Erst bei vollständig reifen Cysten (Fig. 97 Tab. VI) war es in den Restkörpern wieder zu finden. Ungefähr 24 Stunden nach dem ersten Sichtbarwerden der Cysten beobachtete ich verschiedene Male Cysten mit einem bläulich grünlichem Reflex nnd auffälliger grobkörniger Pigmentbildnng (vgl. Fig. 95 Tab. VI), deren Bedentung mir jedoch nicht ganz klar geworden ist. Da die Cysten nicht selten in Gemeinschaft mit etwas mehr erwachseneren Cysten zusammen vorkamen, deren Inhalt stets körnig dunkel war, so ist die Möglichkeit nicht ansgeschlossen, daß es sich hier vielleicht um Cysten handelte, in denen später „Blackspores" gefunden wurden.

Die weitere Entwicklnng im einzelnen zu besprechen kann ich mir versagen, da sie von der Entwicklnng der Malariacysten kaum abweichend vor sich geht; letztere ist bei LÜHE sehr eingehend und anschaulich in MENSE[1]) S. 240ff. beschrieben.

Im halberwachsenen Znstande zeigten die Cysten eine gröbere Grannlation (Fig. 96 Tab. VI kleine Cyste). Später sind die Sichelkeime deutlich darin wahrzunehmen (Fig. 96 Tab. VI große Cyste). Die Tunica elasticomuscularis umschließt die Cyste, welche eng mit den Epithelzellen des Magens verbunden ist (Fig. 97 Tab. VI). Bei stark durchsichtig gemachten Cysten erkennt man leicht die Restkörper, von denen die neugebildeten Sichelkeime ausgehen (Fig. 97 Tab. VI).[2])

Die Zahl der Sichelkeime in den Cysten von *Stegomyia* schwankte ziemlich beträchtlich. Schätzungsweise sind es meist mehrere Hnndert, sie können sich aber auch bis in die Tausende vermehren. Ihre Entwicklung fällt ungefähr in die Zeit des 6.—8. Tages nach Sichtbarwerden der Cysten oder in die Zeit des 8.—10. Tages nach dem

[1]) MENSE: Handbuch der Tropenkrankheiten Bd. III.

[2]) Die in der Cyste liegenden Sichelkeime sind in der reproduzierten Figur leider etwas schematisiert worden.

Saugen am Vogel. Die Sichelkeime bei *Culex* werden bereits am 6.—7. Tage in den Cysten sichtbar und reifen durchgehends viel eher aus, wie die *Stegomyia*-Cysten. Koch und Ruge fanden ebenfalls bei *Culex* bereits am 6.—7., resp. am 7. Tage den Anfang der Sichelkeime.

Die Zeitangabe für die Entwicklung der Cysten und der Sichelkeime dient freilich nur als großer Durchschnittswert. Es gibt wohl keine andere Entwicklungsphase der Parasiten in der *Stegomyia*, die so variierte, wie gerade die Cysten, und zwar in bezug auf Anlage wie Reifung und Menge. Die verschiedene Placierung hat darin seinen Grund, daß die Blutverteilung im Magen der Mücke eine ungleichmäßige ist. Es war oben darauf hingewiesen, daß sich während des Sitzens und Verdauens der Mücken das Blut im hinteren Teil des Mitteldarmes (Magens) ansammelt; infolgedessen findet auch die Copulation der Gameten und die Entwicklung des Ookineten in diesem Teile des Magens häufiger und intensiver statt als in dem anderen Teil, wo sich meist das abgeschiedene Blutserum anstaut. Die Ookineten suchen ihren endgültigen Ruheplatz auf dem geradesten Wege zu erreichen und siedeln sich daher im Fundus des Magens am meisten an. So entstehen nun auch dort mehr Cysten als im vorderen Teil.

Neben dieser vermehrten Anhäufung von Cysten im hinteren Magenabschnitt geht auch eine schnellere Reifung der dort gelegenen Cysten vor sich, so daß gelegentlich die erst entstandenen Cysten bereits Sichelkeime enthalten, während die anderen nur eben in ihren Anfängen stehen. Ich habe sogar geplatzte und von Sichelkeimen entleerte Cysten gefunden am 12. Tage, wo noch jüngste Anfänge im vorderen Teil des Magens wahrgenommen werden konnten.

Dies läßt sich z. T. wohl so erklären, daß die von der Wandung des Magens zunächst gelegenen und dort gebildeten Ookineten sofort sich in die Magenwandung einbohren und weiter entwickeln können, während die im Innern des Blutkoagulums ruhenden Ookineten erst später zur Einwanderung kamen. Andererseits ist aber auch die so ungleichmäßige Heranreifung der Cysten damit zu erklären, daß, wie wir oben bereits sahen, die Copulation zu ganz ungleicher Zeit erfolgt und bereits oft Ookineten gebildet waren, wenn noch Microgameten ausgesandt wurden.

Im Durchschnitt fand ich bei 27° bei den Stegomyien die Cysten am 13.—14. Tage nach dem Saugen völlig reif, während bei *Culex* die Cysten bereits im Mittel vom 10.—11. Tage zum Austreten

der Sichelkeime vorgeschritten waren. Allerdings gab es Ausnahmen. So konstatierte ich einmal bei *Culex*, daß die Cysten noch nicht am 15. Tage znm Sichelkeimaustritt befähigt waren, während in einem Fall bei *Stegomyia* am 8. Tage bereits Sporozoiten aus den Cysten heraustraten.

Andererseits fand ich auch Stegomyien, deren Speicheldrüsen bereits am 15. Tage mit Sporozoiten gefüllt waren, während am Magen noch unreife Cysten zu beobachten waren.

Derartige weit zurückgebliebene Cysten scheinen jedoch in vielen Fällen gar nicht ganz auszureifen. Anstatt daß Sporozoiten gebildet werden, entsteht in den Cysten ein krümeliger Inhalt, auch Blasen und Vacnolen werden sichtbar, oder es treten mehr oder weniger dickere Klümpchen anf, die mit Osmiumsäure schwarz werden (fettiger Zerfall?).

Experimentell lassen sich solche degenerierte Cysten hervorbringen, wenn man bei *Stegomyia* die Cystenbildung nnd -reifung durch Temperaturerniedrigung lange hinausschiebt. Bei Temperaturen nnter 20⁰—22⁰, wo, wie oben erwähnt, erst nach 8 Tagen die ersten Anfänge zn sehen sind, kann man nach 20 Tagen ebenfalls noch nnentwickelte Cystchen sehen, welche niemals mehr ausreifen, sondern allmählich einer Degeneration anheimfallen, ohne daß damit der Mücke selbst anscheinend Schaden zugefügt wird. Ganz ähnliche Beobachtungen machte auch Ruge bei seinen *Culex-Proteosoma*-Studien.

Der dritte Punkt, der bei den Cysten anßerordentlich variiert, ist die Menge derselben. Hier mag zusammenfassend gleich berichtet werden, daß die Zahl der entwickelten Cysten bei *Stegomyia* eine relativ kleine genannt werden muß, sowohl was die Anzahl der in einem Magen vorkommenden Cysten anbetrifft als auch die entwicklungsfähige Menge von Cysten bei den Stegomyien überhaupt. Um den Unterschied dentlich hervortreten zn lassen möchte ich nur anführen, daß Ross bei der Untersuchnng von 10 *Culex*-Mücken einmal 1009, ein anderes Mal bei 10 Mücken 292 Cysten zählte, d. h. pro Mücke 100, das andere Mal 29 im Mittel. In einem Falle fand er auf einem Mückenmagen 445 Cysten nnd Grassi einmal am *Anopheles*-Magen bis 500. Für *Culex* kann ich die enorme Anzahl von Cysten, die sich gelegentlich bildet, vollständig bestätigen. Ich verfüge über verschiedene Präparate, wo die Menge ins Ungemessene steigt und in der Tat kein Platz am ganzen Magen zu finden ist, wo noch eine Cyste Platz hätte. In diesen Fällen dürfte die Zahl der Cysten nahe an 500 herankommen oder sie noch über-

treffen. Man kann die Zahl nicht absolut sicher ermitteln, weil der Magen nicht in einer Fläche ausgebreitet ist, sondern in Form eines Cylinders oder einer Trommel im Präparat vor uns liegt und die beiden Wände flach aufeinanderliegen, wobei sich die Cysten z. T. überdecken und nicht genau zu zählen sind. Von den höchsten Zahlen herab bis zu 20—30 Cysten findet man alle Abstufungen. Weniger als 20 Cysten am *Culex*-Magen — vorausgesetzt daß überhaupt Cysten entwickelt wurden — habe ich nicht gefunden.

Anders ist es bei *Stegomyia.* Hier fand ich nur einmal als Höchstzahl 36 Cysten, als niedrigste 1 Cyste. Die Zahl der Cysten ist bei *Stegomyia* sehr beschränkt und diese Erscheinung scheint ein Beweis dafür zu sein, daß sich *Stegomyia fasciata* überhaupt nicht für eine Weiterentwicklung von *Proteosoma*-Parasiten besonders eignet. Ich zählte bei 57 Mücken, die Cysten entwickelt hatten,

in	1	Falle	36	Cysten
„	1	„	22	„
„	1	„	18	„
„	1	„	13	„
„	2	Fällen	11	„
„	4	„	9	„
„	9	„	8	„
„	11	„	7	„
„	16	„	5	„
„	4	„	6	„
„	4	„	3	„
„	2	„	1	„
„	1	Falle	2	„

Auch die Prozentzahl der Stegomyien, die Cysten entwickeln konnten, ist außerordentlich gering und beweist ebenfalls die wenig günstige Beschaffenheit der Mücke für die endgültige Ausbildung der Parasiten. Von 2573 Stegomyienweibchen, welche angesetzt wurden, sogen 789 = 30,7%. Davon starben im Lauf der Beobachtung 26. Von den übrigen 763 wurden zur Untersuchung für Microgameten und Ookinetenentwicklung 210 verbraucht. Die restierenden 553 waren zur weiteren Beobachtung bestimmt und es fanden sich unter 501 Mücken 57, welche Cysten entwickelt hatten = 11,4%. Die letzten 52 wurden zu Übertragungsversuchen verwendet und zur Präparation von Speicheldrüsen.

Meine Statistik über die Brauchbarkeit der *Culex* für Proteosomaentwicklnng lautet viel günstiger: Unter 365 *Culex*-Weibchen sogen 234 = 64 %. Davon starben 8 bei der Anfbewahrung. Von den übriggebliebenen 226 verwandte ich 102 zum Nachweis von Microgameten nnd Ookineten. 124 blieben zurück. Davon wurden 20 für Übertragungsversuche zurückbehalten und 104 auf Cysten nntersncht. Dabei fanden sich 85 Mücken infiziert = 81,7 %.

Ross berichtet, daß einmal von 245 *Culex* 178 = 72 % Cysten entwickelten, ein anderes Mal von 81 *Culex* 76 infiziert waren = 94 %. Diese Zahlen würden mit meinen Befunden bei *Culex* gut übereinstimmen. Es ist zu begreifen, daß ich im Anfang meiner Untersnchnngen, als ich von der geringen Fähigkeit der Stegomyien Cysten zn entwickeln noch keine Ahnnng hatte nnd den immer wiederkehrenden negativen Ausfall der Magennntersuchung anf Cysten sehr entmutigt wurde, glaubte, die Entwicklung der Parasiten reiche überhaupt nur bis zur Ookinetenbildung. Erst die Wiederaufnahme mit großen Massen von Stegomyien brachte dann die Überzeugung und den Beweis, daß, wenn anch nur in 11,4 %, aber doch eine Cysten-Sichelkeimbildung vor sich geht.

Ross'sche Körper oder „Blackspores".

Die eigentümlichen Gebilde, welche Ross znerst bei der Entwicklnng von *Proteosoma*-Cysten im Mückenmagen sah, nnd die er zunächst als „Blackspores" bezeichnete, haben auch alle späteren Forscher angetroffen. Grassi z. B. fand sie bei *Anopheles*, Koch nnd Ruge bei *Culex pipiens*. Ich konnte sie ebenfalls bei *Culex* und auch bei *Stegomyia* feststellen. Man findet sie nicht häufig, aber sie scheinen doch gelegentlich bei allen Stechmücken, welche Cysten entwickeln, vorkommen zu können. Der Grund ihres Anftretens, die Ursache ihrer Entstehnng nnd ihre Bedeutung sind einstweilen noch nicht genan bekannt. Ruge hat ermittelt, daß regelmäßig Blackspores auftraten, wenn *Culex* an infizierten Sperlingen gesogen hatten, die an einer natürlichen Infektion litten. Sogen die Mücken dagegen an künstlich infizierten Kanarienvögeln, so fand er nur sehr selten Blackspores. Ich habe nnter den 2573 Stegomyien, von denen 789 gesogen hatten, nur zwei Mücken mit blackspores-haltigen Cysten gefunden nnd unter den 365 *Culex*, von denen 234 gesogen hatten, ebenfalls nnr zwei Mücken mit diesen Gebilden. Es stimmt also jedenfalls die Beobachtung Ruge's, daß beim Blutsaugen von künstlich infizierten Kanarienvögeln nur sehr selten die

Blackspores auftreten. Damit ist aber über die Entstehung dieser Spores noch nichts weiteres gesagt. Da Grassi die Ross'schen Sporen meist im Winter antraf, so läge die Möglichkeit vor, daß sie Degenerationsprodukte, durch Temperatnreinflüsse bedingt, sein könnten. Vielleicht gibt es verschiedene Einflüsse, die wir noch nicht kennen. Immerhin glaube ich aber, daß man wohl an der Annahme festhalten kann, daß die Gebilde Degenerationsformen von Sichelkeimen darstellen. Mein Material ist zu klein, als daß ich ans den wenigen nntersnchten und gefundenen Cysten etwas Sicheres schließen könnte, doch kam ich zu der gleichen Auffassung dadurch, daß ich in allen beobachteten Cysten neben den veränderten auch normale Sichelkeime fand. Anffällig schien mir, daß auch in noch verhältnismäßig jungen Cysten schon derartige Gebilde zn finden waren, die sonst noch nicht soweit herangebildet sein konnten. Ich vermutete deshalb in den nmgewandelten Sichelkeimen ein vorzeitiges hypertrophisches Wachstum der normalen Anlagen der Sichelkeime, welches alsbald zur Degeneration der Sporozoiten führen muß. Je älter letztere werden, desto grotesker werden ihre Formen nnd daher sieht man auch, wie es Ruge in seinen Malariastudien abbildet später zuweilen außerordentlich große, scharf gebogene z. T. abgehackte dicke Formen, welche das Mehrfache eines normalen Sichelkeimes an Stärke überragen. Zuerst, wenn die Umwandlung und das Wachstum der Blackspores beginnt, haben sie noch die Form von normalen Sporozoiten, werden alsbald aber dicker nnd dunkler. Das Protoplasma wird körnelig und schiebt sich z. T. zusammen, wie es bei degenerierten Schimmelpilzzellen und Bakterien oft zu beobachten ist. Dabei ist die Zahl der Blackspores in den Cysten stets eine sehr beschränkte im Vergleich zn den Hunderten von Sichelkeimen, die sonst entstehen. Ich zählte in manchen Cysten nur einige wenige, in anderen vollgefüllten im fast erwachsenen Znstande kanm mehr als 100 (Fig. 99 Tab. VI). Reifen die Blackspores weiter heran bis zum Platzen der Cysten, so zeigen sie dann recht verschiedene Formen, die znm Teil zwar plnmper sind als normale Sporozoiten, aber doch noch an ihre nrsprüngliche Form erinnern (Fig. 100 Tab. VI), oder aber sie wachsen zu so eigentümlichen großen gebogenen Formen aus.

Eine Bewegung der freien Blackspores konnte ich nicht beobachten.

Die Sporozoiten in den Speicheldrüsen und die Übertragung derselben auf Kanarienvögel durch Stegomyien.

Nachdem die Sporozoiten aus den geplatzten Cysten in das Lakunom der Mücke gelangt sind, findet man sie bekanntlich nach einer gewissen kurzen Zeit in den Speicheldrüsen wieder. Für *Proteosoma* hat Koch und Ruge nachgewiesen, daß sie sich bei *Culex* dort in den mittleren Lappen vornehmlich festsetzen. Die bei *Stegomyia* darauf gerichteten Untersuchungen ergaben, daß ebenfalls der mittlere Lappen der Speicheldrüsen bevorzugt ist. Ich habe nnr ein einziges Mal in einem Seitenlappen einzelne verstrente Sichelkeime gefunden, bei allen anderen, die ich untersuchte, sah ich aber den Mittellappen vollgefüllt. Die Ursache dieser eigentümlichen Abwanderung nach dem Mittellappen sucht Lühe anf das verschiedene Secret des Mittellappens und der Seitenlappen zurückzuführen.

Die Zeit, in der die Sichelkeime in den Speicheldrüsen vorgefnnden werden, richtet sich natürlich nach dem Heranreifen der Cysten. Da letzteres im Mittel bei den Stegomyien am 13. bis 14. Tage beendet war, so konnte man auch in diesen Tagen bereits Sichelkeime vorfinden. Es machte mir den Eindruck, daß die Speicheldrüsen sich von Tag zu Tag mehr füllten, entsprechend der Menge der von Tag zu Tag mehr aus den Cysten austretenden Sichelkeime, dabei fanden sich, wie ich schon oben erwähnte, gelegentlich zu derselben Zeit noch ganz unentwickelte Cysten am Magen. Fig. 98 auf Tab. VI zeigt ein Stück des Mittellappens einer *Stegomyia fasciata*, aus welchem unter leichtem Druck eine größere Menge von Sporozoiten aus den Drüsenzellen ausgepreßt werden. Einmal fand ich schon am 10. Tage Sichelkeime in den Speicheldrüsen vor, was aber bei *Stegomyia* wohl als Ausnahme zu betrachten sein dürfte. Koch sah sie bei *Culex nemorosus* gewöhnlich am 9. bis 10. Tage.

Die aus den präparierten Speicheldrüsen gewonnenen freien Sporozoiten bewegten sich in physiologischer Kochsalzlösnng merklich, wenn anch nicht sehr lebhaft. Die Bewegung hörte aber im geheizten Mikroskop bei 37° nach 1 Stunde anf. Ruge untersuchte Sichelkeime aus den Speicheldrüsen von *Culex pipiens* in Kanarienserum und Kanarienblnt nnd fand die Bewegung lebhaft und bei 41° viel länger dauernd (2—3 Stunden).

Freie Sichelkeime sind in Fig. 103 abgebildet. Beim Herauspressen aus Magencysten gelingt es zuweilen noch Stücke vom Rest-

körper, an denen die Sporozoiten saßen, mit heransznbekommen. Fig. 102 und 101 zeigen solche in verschiedener Vergrößernng.

Es gelang mir nicht, nnter den einzelnen Sporozoiten die von Schaudinn gesehenen männlichen und weiblichen nnd indifferenten Formen zu beobachten; dagegen zeigte eine große Reihe von Sichelkeimen neben dem größeren Kern in der Mitte des Zelleibes noch einen zweiten kleinen Kern, der sich mit der Giemsa-Lösnng dentlich sichtbar machen ließ. Dieser Kern dürfte dem Blepharoplasten der Trypanosomen entsprechen und es kämen solche Formen der von Schaudinn gekennzeichneten indifferenten Form mit undulierender Membran- und trypanosomenähnlichem Aussehen näher. Doch es fehlten unserer Form sowohl die undulierende Membran wie auch das Anssehen eines echten Trypanosomas. Sie waren einfach spindelförmig, an beiden Seiten zugespitzt und die Färbung blieb immer die gleiche.

Über das Verweilen der Sichelkeime in den Speicheldrüsen bei Stegomyien, falls letztere nicht dnrch den Stich sich derselben entledigen konnten, habe ich einige Versnche angestellt, welche ergaben, daß bei 27° in einem Zeitraum von 22 Tagen bei Fütternng mit Znckerlösung sich noch Sichelkeime in den Speicheldrüsen vorfanden. Da ich den Rest meiner infizierten Mücken zu Stech- nnd Übertragungsversnchen reservieren mnßte, so konnte ich weitere Beobachtungen, ob sich die Sichelkeime noch länger halten würden, nicht anschließen. Nach den von Ruge bei *Culex* gemachten Erfahrungen, wonach Sichelkeime noch nach 45 Tagen lebend und beweglich waren, ist an die Möglichkeit zu denken, daß anch die Sporozoiten in der Speicheldrüse der Stegomyien länger am Leben bleiben.

Nachdem ich mich dnrch Präparation von einigen Mücken überzengt hatte, daß die Sporozoiten in die Speicheldrüsen eingewandert waren, setzte ich 40 Stück Stegomyien, die 20—25 Tage vorher am infizierten Kanarienvogel gesogen hatten und die ganze Zeit mit Zuckerlösung gefüttert worden waren, zn zwei Kanarienweibchen, deren Blnt von Parasiten frei befunden war. Die Vögel waren kurz geschoren nnd in die weitmaschige Drahtgaze eingewickelt. Im Verlanf von 1½ Stnnden hatten im ganzen 26 Stück gestochen und Blnt gesogen. Sechs weitere Mücken uahmen noch über Nacht Blut. Die letzten acht stachen nicht.

Bei der Blutuntersuchung der Kanarienvögel fand ich bei dem einen *Proteosoma*-Parasiten nach 8 Tagen, beim anderen nach 12 Tagen. Die Übertragung war

also gelnngen nnd der Cyclns geschlossen. Damit war auch der Beweis geliefert, daß *Proteosoma* in der *Stegomyia* weiter entwickelt werden nnd von ihr übertragen werden kann.

Die *Stegomyia*, welche nun zum zweiten Male Blut gesogen hatten, legten wieder Eier nnd hielten sich bei der Zuckernährnng weiterhin lebensfähig. Die Hälfte davon habe ich seziert nnd bei einigen Reste von Sichelkeimen in ihren Speicheldrüsen gefunden, womit ich nachträglich noch die Garantie erhielt, daß wenigstens einige von den 40 angesetzten Mücken gefüllte Speicheldrüsen gehabt haben mußten. Die Cysten am Magen waren alle geplatzt und nichts mehr von Sichelkeimen vorhanden.

Einige von den überlebenden sogen 15 Tage später zum dritten Male Blut; ohne daß sie in dieser Periode abstarben. Im Gegensatz hierzn hatte Koch beobachtet, daß *Culex nemorosus* nicht zum zweitenMale Blnt sog, sondern nach dem Eierlegen abstarb.

Prüft man die Frage, von welchem Termin an *Stegomyia* von neuem übertragen kann, so wird man nach den vorliegenden Experimenten eine allen Verhältnissen Rechnung tragende Antwort dahin geben können, daß bei einer Durchschnittstemperatnr von 27° (Tropenmitteltemperatur) innerhalb von 3 Wochen die neue Übertragung stattfinden kann.

In Anbetracht der Möglichkeit, die Koch zuerst in Erwägung zog, daß die Übertragung der Parasiten durch die Eier auf die Nachkommen stattfinden könnte, habe ich bei jeder *Stegomyia*, welche Cysten hatte, die Eier nntersucht, aber nirgendswo Sporozoiten finden können. Es wäre dies von ganz besonderem Interesse gewesen, da ja Marchoux bei *Stegomyia* die Übertragung des Gelbfiebers anf die Nachkommen durch die Eier festgestellt hat. Eine praktische Bedentung besitzt dieser Modus anch für die Verbreitnng jener Seuche nicht.

Alles was in den Versuchen mit den brasilianischen Stegomyien beobachtet und erreicht wurde, gilt auch für die afrikanischen aus Togo. Es konnte in keiner Weise in der Ansbildung nnd Heranreifung der Parasiten ein Unterschied konstatiert werden.

Die Übertragungsversnche mit *Proteosoma* durch *Culex pipiens*, welche ebenfalls glückten, bieten nichts Besonderes. Da sie auch von Koch und Ruge bereits früher schon beschrieben sind, so erübrigt es mir daranf nochmals einzugehen.

Erwähnen will ich noch, daß **pathologische Veränderungen** unter den in der Gefangenschaft aus Eiern gezüchteten Stegomyien **sehr selten** sind. Ich habe in den an weit über 1000 sezierten Stegomyien nur zweimal etwas Pathologisches gefunden. Einmal eine merkwürdige Zweiteilung des Magens, indem aus dem Mitteldarm eine sackförmige Ausstülpung, die ca. die Hälfte des Magens betrug, herausgewachsen war und ein anderes Mal glockenartig pendelnde Cysten im Lumen des Magens. Sie hatten mit den *Proteosoma*-Cysten nichts zu tun, auch konnte ich diese Veränderungen mit keinem bei Ruge und Ziemann beschriebenen Parasiten- oder pathologischen Befund identifizieren.

Zusammenfassung:

In den vorstehenden Untersuchungen und Experimenten wurde der Beweis erbracht, daß *Stegomyia fasciata Plasmodium praecox* (*Proteosoma*) durch Stich auf Kanarienvögel zu übertragen imstande ist und gleichzeitig wurde die Entwicklung der Parasiten im Magen und in den Speicheldrüsen der *Stegomyia*, die Copulation, Microgametenbildung, Cystenbildung und Sporozoitenentwicklung klargelegt.

Bisher wußte man nur, daß die Culiciden, *Culex pipiens, fatigans* und *nemorosus Proteosoma* übertragen konnten.

Die Stegomyien stammten aus **Brasilien** (Rio de Janeiro) und aus **Afrika** (Togo). Die Übertragung gelang mit beiden Arten in der gleichen Weise.

Als Parallelversuche dienten Experimente mit *Culex pipiens*, mit denen die Übertragung ohne Schwierigkeit ausgeführt werden konnte.

Im allgemeinen verläuft die ganze Entwicklung der Parasiten in der Stegomyia analog der Entwicklung von *Proteosoma* in *Culex* und Malaria in *Anopheles*.

Ein auffallender Unterschied besteht 1. in der weit geringeren Fähigkeit die Parasiten weiter zu bilden im Gegensatz zu *Culex*, 2. in der verzögerten Entwicklung aller Phasen der Parasiten, besonders der Ookineten, Cysten und Sporozoiten, und 3. in dem ziemlich unregelmäßigen Verlauf der Entwicklung.

Hieraus muß der Schluß gezogen werden, daß sich die *Stegomyia fasciata* für die Übertragung von *Proteosoma* relativ wenig eignet und praktisch wahrscheinlich keine sehr erhebliche Rolle dabei spielen wird. Von 2573 Stegomyien, die an infizierte Kanarien-

vögel gesetzt wurden, sogen nur 789 = 30,7%. Von 501 Stegomyien, welche Blut aufgenommen hatten, entwickelten nur 57 = 11,4% reife Cysten und Sichelkeime.

Von 365 *Culex*-Mücken sogen dagegen 234 = 64%. Und von 104 *Culex*, welche Blut gesogen hatten, entwickelten 85 = 81,7% reife Cysten und Sichelkeime.

Während die Dauer der Gesamtentwicklung vom Saugakt bis zum Einwandern der Sporozoiten in die Speicheldrüsen bei *Culex* 9—11 Tage beträgt, verzögert sich die Entwicklung bei *Stegomyia* bis auf 13—15 Tage.

Die einzelnen Entwicklungsphasen verlaufen im Mittel in folgenden Zeitabschnitten (vom Saugakt an gerechnet):

Bei *Culex*:	Bei *Stegomyia*:
Microgametenbildung: ca. 1/2 bis 3/4 Std.	Microgametenbildung: ca. 1/2 bis 1 Std.
Copulation: ca. 1/2—1 Std.	Copulation: ca. 1/2—1 1/2 Std.
Ookinetenbildung: ca. 10—12 Std. (Beginn), Hauptmenge nach 20 Std., Verschwinden der Ookineten nach 48 Std.	Ookinetenbildung: ca. 16 Std. (Beginn), Hauptmenge nach 26 Std., Verschwinden der Ookineten nach 72 Std.
Cystenbildung: ca. 30 Std.	Cystenbildung: Nie vor dem 3.—4. Tage.
Sporozoitenbildung (in den Cysten): ca. 6—7 Tage.	Sporozoitenbildung (in den Cysten): ca. 8—10 Tage.
Überwandern in die Speicheldrüsen: ca. 9—11 Tage.	Überwandern in die Speicheldrüsen: ca. 13—15 Tage.

Sämtliche hier angegebenen Daten beziehen sich auf eine konstante Temperatur von 27°, in der die Mücken gehalten wurden, und auf eine relative Feuchtigkeit von 75%—80%.

Vermindert man die Temperatur auf 20°—22°, so tritt in der Ookinetenbildung, Cystenbildung und Sporozoitenbildung eine sehr wesentliche Verzögerung ein. Nur die Microgametenbildung und auch die Copulation werden nicht besonders beeinflußt.

Bei niedriger relativer Feuchtigkeit, etwa 40% verlangsamt sich die Entwicklung der Cystenanfänge auf mindestens 2 Tage.

Die Schwankungen in der Entwicklung bei niederer Temperatur sind in allen Phasen sehr groß, so daß keine genauen Mittelzahlen sich angeben lassen und die Schwankungen in den Anfängen der Cystenbildung sind wiederum abhängig von der Copulation und der Aussendung der Microgameten.

Die Microgametenbildung spielt sich langsamer ab als wie bei

Malaria und *Halteridium* und geht auf dem Objektträger schneller vor sich als im Mückenmagen.

Die Aussendung der Microgameten hat seine Ursache in Dichtigkeitsdifferenzen des die Parasiten umgebenden Mediums (Blut, Serum, physiologische Kochsalzlösung). Auch die Temperatur und der Magensaft spielen eine Rolle.

Die Microgametenbildung der *Proteosoma*-Parasiten im *Stegomyia*-Magen weicht von der bisher bekannten Art der Entwicklung ab.

Es wurden Microgameten mit Verzweigungen (resp. in Teilung begriffen?) beobachtet.

Die Aufnahmefähigkeit von Blut in den Magen einer weiblichen *Stegomyia* bei einem Durchschnittsgewicht von 1,28 mg beträgt im Mittel 1,6 mg. Ein Männchen wiegt nur 0,86 mg.

Bei der Entwicklung der Cysten wurden auch solche mit Rossschen Körpern (Blackspores) aufgefunden. Sie sind als äußerst selten bei *Stegomyia* anzusehen, da unter 789 untersuchten Tieren nur 2 Exemplare derartige Cysten aufwiesen.

Es spricht vieles dafür, daß die Blackspores vorzeitig hypertrophierende und alsbald degenerierende Formen von normalen Anfängen von Sichelkeimen sind.

Bei den freien Sichelkeimen aus den Cysten und den Speicheldrüsen ließ sich ein zweiter kleiner Kern (Blepharoplast) beobachten.

Die Sporozoiten in den *Stegomyia*-Cysten und Sichelkeimen zeigten nur schwache Bewegung.

Pathologische Veränderungen konnten bei mehr als 1000 genau untersuchten Stegomyien nur verschwindend wenig gefunden werden. In einem Falle fand sich ein geteilter Magen, im anderen Falle glockenförmig gestielte durchsichtige Cysten, die aber mit *Proteosoma*-Cysten nichts zu tun hatten und nicht als etwas Bekanntes diagnostiziert werden konnten.

Tafelerklärung.

Giemsa-Färbung. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 4 = 1000 : 1.

Tafel IV.

Fig. 1—19. Schizogonie des *Plasmodium praecox*.
Fig. 1—3. Jüngste Parasiten im Kanarienvogelblutkörperchen.
Fig. 1 u. 3. Doppelinfektionen.
Fig. 2 u. 3. Polychromatophile Blutkörperchen.

Fig. 4. Das Protoplasma der Blutkörperchen ist zerfallen, der Kern etwas aufgequollen. Zwei junge Parasiten sind in der Nähe des Kernes zurückgeblieben.

Fig. 5. Kernloses Blutkörperchen mit halberwachsenem Parasiten.

Fig. 6. Parasit in Teilung begriffen. Der Kern des Blutkörperchens ist in typischer Weise auf die Seite gedrängt.

Fig. 7. Teilung des Parasiten vollendet im kernlosen Blutkörperchen.

Fig. 8. Das Protoplasma des Blutkörperchens ist zerfallen. Der Parasit ist frei geworden, hängt aber noch mit dem Kern zusammen. Die Teilungsstücke (Merozoiten) liegen noch beieinander. Das braunschwarze Pigment hat sich als kleines Klümpchen zusammengeschoben.

Fig. 9. Wie bei Fig. 8. Die einzelnen Merozoiten weichen auseinander.

Fig. 10. Teilungsfigur außerhalb des Blutkörperchens. Kleine „Gänseblümchen"form. Die Zahl der gebildeten Merozoiten ist bald größer, bald kleiner.

Fig. 11 u. 12. Freie Merozoiten.

Fig. 13—18. Zwergformen von Parasiten, die auf einem niederen Standpunkt der Entwicklung stehen geblieben sind. Sie finden sich vielfach frei im Blute, nachdem frühzeitig das Protoplasma des Blutkörperchens zugrunde gegangen ist und sie frei geworden sind. Gelegentlich gelangen die Formen noch bis zur Drei- und Vierteilung (Fig. 16—18).

Fig. 19. Vollendete Dreiteilung im Blutkörperchen.

Fig. 20. Doppelinfektion eines Blutkörperchens, welches bereits ganz aufgezehrt ist, mit einem weiblichen Gameten und einem Schizonten.

Fig. 21. Doppelinfektion mit einem männlichen Gameten und einem Parasiten in vollendeter Teilung.

Fig. 22. Chromatophiles Blutkörperchen mit jungen Microgametocyten.

Fig. 23—26. Freie Microgametocyten. Die Größe derselben schwankt erheblich.

Fig. 27. Junger Macrogamet im Blutkörperchen. Der Kern ist in der typischen Weise beiseite gedrängt.

Fig. 28 u. 29. Freie reife Macrogameten.

Fig. 30—36. Ungefärbte Präparate, beobachtet im hängenden Tropfen.

Fig. 30—32. „Geißelnde" Microgametocyten, d. h. Aussendung von Microgameten aus den Microgametocyten. Ungefärbt.

Fig. 33. Microgametocyt nach Aussendung aller Microgameten. Drei Microgameten hängen noch am Microgametocyten.

Fig. 34—36. Microgameten, abgelöst vom Microgametocyten, zum Teil agglomeriert; die meisten sind körnig degeneriert.

Fig. 37. Microgametocyt nach Ausstoßung des Protoplasmas. Das Chromatin hat sich bereits geteilt als Vorgang vor der Aussendung der Microgameten.

Fig. 38—42. Entwicklung, „Aufrollung" der Microgameten aus den Microgametocyten. Die Microgameten gehen direkt aus dem Chromatin hervor. Das Pigment wird mit herausgeschleudert.

Fig. 43. Freie Microgameten.

Fig. 44. Freie Microgameten mit „Verzweigungen" (oh Teilung?).

Tafel V.

Fig. 45—47. Ungefärbte Präparate; Beobachtung im hängenden Tropfen.

Fig. 45—52. Weibliche Gameten (Macrogameten) während des Eindringens von Microgameten (Copulation).

Fig. 45. Macrogamet, stark pigmentiert, mit ausgesprochener Vorwölbung des Zellinhaltes an der Eintrittsstelle des Microgameten.

Fig. 46. Stark pigmentierter Macrogamet.

Fig. 47. Macrogamet mit Resten und degenerierten Fäden von Microgameten, die nicht in den Macrogameten eindringen konnten.

Fig. 48, 50, 51. Macrogameten, in die der Microgamet zum Teil bereits eingedrungen ist.

Fig. 49. Eindringen von zwei (?) Microgameten. Daneben ein freier Microgamet.

Fig. 52. Macrogamet, „umgeißelt" von vielen Microgameten.

Fig. 53—56. Macrogameten kurz nach der Aufnahme des Microgameten. Neben einem großen Kern ist auch noch ein kleinerer sichtbar. (Nach Schaudinn: noch nicht verschmolzener Kern eines Microgameten.)

Fig. 57. „Überfruchtung" durch einen zweiten Microgameten, der in den Macrogameten eingedrungen ist.

Fig. 58. Jüngster Ookinet. Ein Microgamet versucht vergebens hineinzugelangen.

Fig. 59—62. Ganz junge Ookineten; sie zeigen bereits Anfänge von Ausstülpungen.

Fig. 63—67. Ookineten mit beginnenden Fortsätzen Man sieht bei Fig. 59, 60, 63 den noch nicht verschmolzenen Microgameten noch deutlich.

Fig. 68—71. Ookineten, sogenannte „Retortenform".

Fig. 72—75. Ookineten, gestreckte Formen.

Fig. 76—80. Ookineten, gekrümmte Formen.

Fig. 74, 75, 78, 79. } Ookineten: möglicherweise { weibliche Formen.
Fig. 68, 69, 73, 76, 80. } Ookineten: möglicherweise { männliche Formen.

Fig. 81—92. Ookineten: Zerfallsformen. Das Protoplasma lockert sich zunächst auf und fällt dann auseinander, aber erst später zerfällt das Chromatin.

Tafel VI.

Fig. 93. **Mitteldarm (Magen)** von *Stegomyia fasciata*. 10 Tage nach dem Saugakt am infizierten Kanarienvogel. Der Magen ist besetzt mit neun fast ausgewachsenen Cysten. Ungefärbtes Präparat. Leitz Obj. 1, Oc. 2 = 22 : 1. a) Cysten, b) Tracheen, c) Malpighi'sche Gefäße (abgeschnitten), d) vorderer Teil des Magens, e) Kontraktionsfalten.

Fig. 94. **Stück vom Magen** von *Stegomyia fasciata* **mit zwei jüngsten Cysten.** 7 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Die Cysten zeigen mehrere Pigmentkörnchen und sind an ihrem Reflex kenntlich. Sie liegen auf dem Magenepithel und sind mit diesem verbunden. Die Magenmuskulatur geht über die Cysten hinweg. Leitz Obj. 7, Oc. 4 = 600 : 1. a) Cysten, b) Tracheen, c) Magenepithel.

Fig. 95. **Stück vom Magen** von *Stegomyia fasciata* **mit einer jungen Cyste.** 8 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Die Cyste zeigt einen auffallend grünlichen intensiven Reflex (Vorstufe der Cysten mit Ross'schen Körpern ?) und ist stark körnig pigmentiert. Leitz Obj. 7, Oc. 5 = 780 : 1. a) Cyste, b) Magenepithel.

Fig. 96. **Stück vom Magen einer** *Stegomyia fasciata* **mit einer halberwachsenen und einer fast reifen Cyste.** 11 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Nach der Präparation mit Osmiumsäuredämpfen fixiert. Die kleinere Cyste grob granuliert als Vorstadium der Sporozoitenbildung. In der größeren

Cyste zahlreiche Sichelkeime. Über die Cysten geht die contractile Magenmuskulatur hinweg. Leitz Obj. 7, Oc. 4 = 600:1. a) Cyste vor der Sichelkeimbildung, b) Cyste mit Sichelkeimen, kurze Zeit vor dem Platzen, c) Magenepithel, d) contractile Magenmuskulatur.

Fig. 97. Stück vom Magen einer *Stegomyia fasciata* mit einer reifen Cyste. 14 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Nach der Präparation mit Osmiumsäuredämpfen fixiert. In der ziemlich durchsichtigen Cyste sind die „Restkörper" mit groben Pigmentkugeln und die reifen Sichelkeime deutlich zu sehen. Leitz Obj. $^1/_{12}$ Imm, Oc. 4 = 1000:1. a) Cystenwand, b) Sichelkeime, c) Restkörper, d) Pigment, e) Epithelzelle des Magens, f) Magenmuskulatur.

Fig. 98. Stück vom Mittellappen einer Speicheldrüse von *Stegomyia fasciata* mit Sichelkeimen. 15 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Nach der Präparation mit Osmiumsäuredämpfen fixiert. Das Präparat ließ durch einen Druck auf die Drüse die Sichelkeime heraustreten. Leitz Obj. 7, Oc. 5 = 780:1. a) Drüsenzellen, b) Speicheldrüsenausführungsgang, c) Speicheldrüsen.

Fig. 99. Stück vom Magen einer *Stegomyia fasciata* nebst einer Cyste mit Blackspores (Ross'sche Körper). 13 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Die Cyste enthält wenig Sporozoiten, welche dunkel gelbbraun erscheinen. Vermutlich Degenerationsprodukte der Sichelkeime. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 2 = 650:1. a) Cyste mit „Blackspores", b) Magenepithel.

Fig. 100. Freie Ross'sche Körper (Blackspores). 15 Tage nach dem Saugakt. Ungefärbt. Die Gebilde sind kürzer, dicker, plumper als die gleichaltrigen geraden normalen Sporozoiten, dabei dunkel braungelb und unregelmäßig gefärbt. Die Form ist bald gestreckt, bald gekrümmt, bald an den Enden rundlicher, bald spitzer. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 4 = 1000:1.

Fig. 101. Sporozoiten am Restkörper sitzend. 14 Tage nach dem Saugakt. Mit Giemsa gefärbt. Gewonnen durch Ausdrücken einer reifen Cyste. An den einzelnen Parasiten kann man zwei Kerne beobachten, einen großen und einen winzigen kleinen. Letzterer würde dem Blepharoplasten der Trypanosomen entsprechen. Im Restkörper einzelne Vacuolen sichtbar. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 4 = 1000:1. a) Restkörper, b) Sichelkeime, c) Vacuolen.

Fig. 102. Dasselbe. 10 Tage nach dem Saugakt. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 4 = 1000:1.

Fig. 103. Freie Sporozoiten aus der Speicheldrüse. 15 Tage nach dem Saugakt. Mit Giemsa gefärbt. Die beiden Kerne deutlich sichtbar. Leitz Obj. $^1/_{12}$, Oc. 4 = 1000:1.

(Aus dem Zoologischen Institut zu München.)

Über *Trachelocerca phoenicopterus* Cohn.
Ein marines Infusor.

Von
W. Lebedew.

(Hierzu Taf. VII u. VIII und 7 Textfiguren.)

Die nachfolgende Arbeit habe ich im Institut für vergleichende Anatomie zu Moskau begonnen und während des Jahres 1907 im Zoologischen Institut zu München beendigt.

Nach München habe ich die Tiere teilweise in Gläsern mit Seewasser aus Rovigno geschickt bekommen; den größten Teil meines Materials jedoch verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Leiters der zoologischen Station in Triest, Prof. Cori, von dem ich im April eine Anzahl Wasserproben, die die Tiere enthielten, bekommen habe.

Als Fixierungsmittel benutzte ich sehr verschiedene Flüssigkeiten. Ich bevorzugte aber starke Pikrinessigsäure (konzentr. wäss. Lös. mit 2 Proz. Eisessig) und Flemming'sches Chrom-Osmium-Gemisch, die mir die besten Resultate gaben.

Bei der Färbung der Totalpräparate empfiehlt sich besonders Boraxkarmin Auch Hämatoxylin nach Delafield und Eisenhämatoxylin gaben zuweilen sehr lehrreiche Bilder. Nach Osmium-Fixierung sind außer Eisenhämatoxylin, Magenta-Pikro-Indigo-Karmin und Safranin zu empfehlen.

Neben den Totalpräparaten sind auch Schnitte (2—5) sehr nützlich. Bei einigen Tieren (Stad. „C", siehe unten) ist sogar von Kernstruktur nur auf Schnittpräparaten etwas zu sehen.

Ich erfülle nur meine Pflicht, wenn ich hier am Anfang meiner Arbeit meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. R. Hertwig, für das große Wohlwollen, das er mir nnd meiner Arbeit während der ganzen Zeit entgegengebracht hat, meine Dankbarkeit äußere.

Auch den Assistenten des hiesigen Institnts, den Herren Dr. Goldschmidt und Dr. Popoff, möchte ich für alle ihre liebenswürdigen Unterstützungen danken.

Die Literaturangaben über *Trachelocerca phoenicopterus* sind nicht reichhaltig. Eine unzweifelhafte Beschreibung dieses Infusors finden wir znm erstenmal bei Cohn in seiner Arbeit „Neue Infusorien im Seeaquarium" vom Jahre 1866.

Es ist jedoch sicher, daß *Trachelocerca* schon viel früher beobachtet und von verschiedenen Autoren, wie O. Müller, Ehrenberg, Stein, Dujardin, Claparède et Lachmann, unter verschiedenen Namen beschrieben wurde. Diese Darstellungen sind aber so lückenhaft und unklar, daß sie lediglich historische Bedeutung haben. Da ich die mit diesen Arbeiten verknüpften Fragen der Synonymik für nicht sehr wichtig halte, verweise ich nur auf die Arbeiten von Cohn und Entz, wo dieser Gegenstand ausführlich behandelt ist.

Den Arbeiten von Cohn und Entz reihen sich zwei Arbeiten von Gruber, außerdem kurze Angaben von Kent, Bütschli und Schewiakoff an.

Die äußere Erscheinnng des Infusors wird wegen ihrer Eigentümlichkeit von allen Antoren mehr oder weniger richtig beschrieben. Über den inneren Bau aber, z. B. über die Kerne, haben wir ganz spärliche, oft einander widersprechende Angaben.

Da somit unsere Kenntnisse von *Trachelocerca*, obwohl das Tier im Seewasser so gewöhnlich ist, wie z. B. *Paramaecium* im Süßwasser, sehr lückenhaft sind, bringe ich zuerst alle Tatsachen aus der Biologie und Anatomie des Tieres, die mir festzustellen gelungen sind, und gehe erst dann dazu über, die Struktnr der Kerne und die dort lokalisierten Prozesse zu schildern. *Trachelocerca phaenicopterus* ist eines von den anspruchlosesten marinen Infusorien und kommt, wie es scheint, in allen europäischen Meeren vor. Der gewöhnlichste Fundort ist der Strand stiller Buchten, wo sich faulende Reste von Algen und kleinen Tieren sammeln. Doch gelingt es auch hier nicht, viele Tiere zu finden. Es genügt jedoch stets, von solchen Lokalitäten das Wasser mit dem Sand und den Resten der Algen nach Hause zn bringen, um nach ein paar Tagen Tausende von Tieren zu

bekommen. Cohn hat recht, wenn er *Trachelocerca* als typisches Infusor der Seeaquarien bezeichnet. In Aquarien kann das Tier jahrelang leben und bedarf gar keiner Pflege, wenn nur die Konzentration des Wassers ständig die gleiche bleibt.

In ihrer Nahrung sind die Tiere gar nicht wählerisch. Sie können alles fressen. Ich habe sehr oft Exemplare gesehen, die vollständig mit kleinen grünen Algen gefüllt waren. Andererseits fand ich häufig im Innern des Infusors verschluckte Infusorien, Flagellaten, Eier von Würmern und sogar Würmer selbst.

In den Tieren aus stark faulenden Kulturen kann man verschieden große Knäuel von Bacterien beobachten. Diese Bacterien zeigen eine sehr eigentümliche Erscheinung. Im Innern des Tieres färben sie sich nämlich ungewöhnlich stark mit Kernfarbstoffen (Boraxkarmin), trotzdem die freiliegenden Bacterienhäutchen diese Farbe gewöhnlich nur wenig annehmen.

Die verschluckten Bacterienansammlungen haben ein ganz verschiedenes Aussehen. Bald sind sie kompakte Kügelchen, bald sehen sie wie ein Fadenknäuel aus, auch kann man alle Uebergänge sehen von diesen Zuständen bis zu ganz fein durch das Plasma verteilten, verschieden intensiv gefärbten Massen.[1]) Wegen dieser Fähigkeit, die Farbe stärker anzunehmen, glaubte ich zuerst, Chromidien vor mir zu haben. Doch später konnte ich sicher nachweisen, daß es sich um halbverdaute Bacterien handelt.

Trotz dieser häufigen Anwesenheit der Bacterien im Innern des Infusors kann ich, im Gegensatz zu Entz, *Trachelocerca* doch nicht als typisch bacterienfressende Form wie z. B. *Vorticella* und andere, mit Peristom versehene Infusorien betrachten. Denn es kommt bei ihm nie vor, daß die Bacterien im freischwimmenden Zustand aufgenommen werden, vielmehr vermag das Tier lediglich festsitzende Bacterienüberzüge abzuweiden.

Der Bau des am vorderen Ende liegenden Mundapparats, der im gewöhnlichen Zustand sehr eng ist, zeigt uns, daß das Tier ein Raubinfusor ist. Ich habe selbst die Nahrungsaufnahme beobachtet, die gerade so wie bei anderen Raubinfusorien vor sich geht. Dabei geschieht es, daß das Infusor eine Beute überfällt, die seinen Durch-

[1]) Solche kugelige Bacterienansammlungen, die sich stärker als gewöhnlich färbten, habe ich auch im Innern des *Spirostomum ambiguum* gesehen. Es scheint mir, daß sich die Bacterien im Zelleib vermehren können, ohne dem Infusor zu schaden. Erst bei Eintritt des Hungers werden die Kugeln resorbiert und dienen als Nahrungsmaterial.

messer an Größe bei weitem übertrifft. Die Mundöffnung kann sich dann kolossal erweitern.

Es ist sehr merkwürdig, daß ungeachtet ihrer Anspruchslosigkeit in bezug auf Nahrung und Existenzbedingungen die Kultur der Tiere in Uhrschälchen gar nicht gelang. In meinen Stammkulturen in kleinen Bechergläsern vermehrten sich die Tiere sehr schnell und beanspruchten beinahe keine Pflege. Anders war es in Uhrschälchen. Obwohl ich alle möglichen Methoden ausprobiert habe, um aus einem Tiere hervorgegangene Kulturen zu bekommen, gelang es doch nur in einigen Fällen. Aber auch da starben die Kulturen nach einiger Zeit aus, während die anderen marinen Infusorien bei ganz gleichen Bedingungen sich sehr gut kultivieren ließen und sich sehr schnell vermehrten.

Trachelocerca hat ein sehr eigentümliches Aussehen, vermöge dessen es von allen anderen Infusorien sich sehr leicht unterscheiden läßt. Innerhalb gewisser Grenzen besitzt es eine auffallende Formveränderlichkeit. Eine ungemeine Kontraktionsfähigkeit kann die Konfiguration ein und desselben Exemplars bedeutend verändern. Dazu kommt, wie wir das noch sehen werden, noch eine Art Dimorphismus, der seinerzeit Gruber Anlaß gegeben hat, eine zweite Art von *Trachelocerca* — *Trachelocerca minor* — zu beschreiben (Fig. 1—4).

Im allgemeinen kann man sagen, daß *Trachelocerca* einen langen, wurmförmigen Leib besitzt, der im Querschnitt bald rund, bald oval, ja sogar ganz komprimiert erscheinen kann. In stark gestrecktem Zustand, wie dies beim Schwimmen gewöhnlich der Fall ist, sieht das Infusor wie ein Stäbchen aus. Der Leib geht ganz allmählich in einen dünnen Hals über, der mit einem angeschwollenen Köpfchen abschließt. Am hinteren Ende kommt bei einigen Formen ein Schwanz von verschiedener Länge vor; bei anderen fehlt dieser vollständig.

Je nach dem Grade der Kontraktion kann das Tier alle Übergänge von einer spindelförmigen Gestalt bis zu einer ovalen zeigen.

Die Größe der Tiere kann unglaublich schwanken. Z. B., haben die in Fig. 1 und 2 abgebildeten Exemplare eine Länge von 1 $^1/_2$ mm, die in Fig. 3 gegen 600 μ, Fig. 4 dagegen 300 μ.

Am vorderen Pol des Körpers liegt die Mundöffnung. Nach Angaben von Entz ist der Mundapparat der *Trachelocerca* folgendermaßen gebaut. Die genau im Centrum liegende Mundöffnung führt unmittelbar in einen Schlund von zuweilen ansehnlicher Größe. Außen um den Mund herum liegen vier „kreuzweise stehende Lappen"; zwischen ihnen finden sich vier noch kleinere. Die Lappen können ganz verschieden scharf ausgeprägt sein, und verschwinden zuweilen

ganz. Ähnlich bildet den Mundapparat des Tieres auch Schewiakoff ab.

Diese Darstellung scheint mir gar nicht richtig zu sein. Ich habe eine große Menge lebender Tiere nachgeprüft und konnte niemals einen so gebauten Mundapparat konstatieren. In den Fällen, wo das Köpfchen nicht vollständig von verschiedenen Einschlüssen erfüllt war, konnte ich ganz sicher folgenden Bau erkennen.

Das vordere Ende des Körpers, im Profil gesehen, ist schief abgeschnitten. Die Mundöffnung nimmt das vordere Ende ein und verläuft als eine Spalte von verschiedener Länge auf einer Seite des Körpers. Diese Seite, nach der zu der Kopf abgestutzt ist, und auf welche die Mundöffnung sich fortsetzt, können wir, in Einklang mit anderen Infusorien, als Bauchseite bezeichnen (Fig. 6).

Um den ganzen Mund herum läuft ein eigentümlicher protoplasmatischer Saum, der eine Querstreifung erkennen läßt und einen besonderen Wimperkranz trägt. Das Gebilde kann verschieden weit hervorragen oder vollständig eingezogen sein. Das letztere ist immer der Fall bei fixierten Tieren. Der Saum ist keineswegs ein geschlossener Ring, sondern er zieht sich der Mundöffnung entlang noch weiter auf die Bauchseite hinab und begrenzt dieselbe zu beiden Seiten als schmale Kante (Fig. 5—7). Einen Schlund habe ich nie gesehen. Ich glaube, daß Entz als „Schlund“ die oben beschriebene Fortsetzung des Mundes angenommen hat.

Ein solcher Bau des Mundes läßt uns leicht verstehen, wie das Tier zuweilen eine kolossale Beute verschlucken kann. Es muß dabei die Mundspalte sich noch nach hinten verlängern. Wäre der Mund, wie es Entz annimmt, ein geschlossener Ring, so scheint mir eine so starke Erweiterung ganz ausgeschlossen zu sein. Dieser Bau des Mundapparats stimmt im Prinzip mit dem der meisten Raubinfusorien überein. Eine sehr große Ähnlichkeit finden wir z. B. mit *Dileptus gigas*. Bei dieser Form ist, Schewiakoff's Angaben zufolge, um den Mund herum ebenfalls ein solcher nicht geschlossener quergestreifter Saum vorhanden. Der Unterschied ist hauptsächlich der, daß die Fortsätze des Saums bei *Dileptus* nach vorn zum Rüssel laufen, bei *Trachelocerca* aber, wie wir sahen, rückwärts gerichtet sind. Außerdem ist bei *Dileptus* ein Schlund vorhanden und rings um ihn besondere Stäbchen, die, wie Schewiakoff meint, vielleicht die Querstreifung des Saumes verursachen. Bei *Trachelocerca* fehlen diese und die Querstreifung kann entweder auf die Wimpern zurückgeführt werden, oder der Ausdruck irgendeines inneren elastischen Skelets sein. Ich halte es wohl für möglich, daß manchmal dieser

Saum ein lappiges Aussehen annimmt, nnd dann ähnliche Bilder bietet, wie Entz nnd Schewiakoff sie darstellen; doch bin ich, wie gesagt, sicher, daß die Mundöffnung nie einen geschlossenen Ring bildet.

Am entgegengesetzten Pol endigen einige Formen rund, andere gehen ganz allmählich in einen zngespitzten Schwanz über. Es gibt also zwei Reihen von Tieren, schwanzlose nnd geschwänzte, die sich anch in anderen Merkmalen voneinander nnterscheiden. Wir werden über diesen Gegenstand noch unten sprechen, hier genügt es, nnr die Erscheinung zn konstatieren und zu erwähnen, daß bei geschwänzten Formen die Länge des Schwanzes sehr stark variieren kann.

Am hinteren Ende befindet sich auch der After. Ich kann bestätigen, daß bei schwanzlosen Formen er sich gerade am Pol öffnet, bei geschwänzten mehr oder weniger auf der Seite.

Schließlich kann ich erwähnen, daß die von Cohn beschriebene Längsfalte wirklich vorhanden ist. Entz bestreitet dies nnd glaubt, daß Cohn mit abnormen, veränderten Exemplaren zu tun hatte. Das scheint mir nicht der Fall zu sein. Ich habe die Falte zwar anch nicht immer gesehen. Wie Taf. VII Fig. 9 zeigt, kann sie manchmal sehr stark ausgeprägt sein und beinahe bis zum vorderen Ende sich fortsetzen. Ich habe sie ausschließlich bei mit Schwanz versehenen Formen beobachtet.

Was für physiologische Bedeutung diese Längsfalte hat, ist mir nicht klar. Wie wir später sehen werden, könnte man eine solche Falte bei Exconjuganten an ihrer Trennungsstelle erwarten. Ich habe die Exconjnganten sehr aufmerksam nntersncht, habe aber nie etwas Derartiges gesehen. Auch die Kerne der mit einer solchen Falte versehenen Tiere zeigen keine Merkmale einer vorhergegangenen Conjugation.

Möglicherweise steht dieses Gebilde in irgendeinem Znsammenhang mit der Fähigkeit des Tieres, im kontrahierten Zustande sich an die Unterlage überaus fest anheften zn können.

Diese Eigentümlichkeit ist sehr auffallend. Wenn man ein Tier ans der Uhrschale isolieren will, kommt es sehr oft vor, daß es bei Berührung mit der Pipette plötzlich sich sehr stark kontrahiert nnd sich so fest an der glatten Oberfläche des Uhrglases mit dem hinteren Ende anklebt, daß ein sehr starkes und mehrfach wiederholtes Ab- und Zusaugen des Wassers mit der Pipette notwendig ist, nm das Tier von der Unterlage abznlösen.

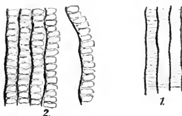
Vielleicht haben wir hier eine ähnliche Einrichtnng vor uns, wie sie Clara Hamburger für *Trachelius ovum* als Sangnapf beschrieben

hat. Taf. VII Fig. 8 zeigt einen Querschnitt durch ein Tier, das eine solche Furche besitzt. Man sieht deutlich, daß die Pellicula an dieser Stelle unterbrochen ist und hier das nackte Protoplasma an das äußere Medium grenzt.

Einmal konnte ich beobachten, daß durch eine solche Falte die vom Tier verschluckten Carmin-Partikelchen entleert wurden, aber ich bezweifle, daß es sich hier um eine normale Erscheinung handelte.

Mit Ausnahme dieser Längsfalten besitzenden Formen sind die Tiere von allen Seiten mit einer ziemlich dicken Pellicula bekleidet, die vollständig homogen aussieht. Auf ihr findet man, wie gewöhnlich auf kleinen Papillen sitzend, sehr lange, ungemein feine Wimpern. Sie stehen dicht nebeneinander und ziehen sich in geraden Reihen von einem Pol bis zum anderen hin. Jede Wimper beginnt mit einem schönen Basalkörperchen. An dem Schwanz und dem vorderen Ende sind die Wimpern größer. Den Mund umziehend sieht man, wie schon erwähnt wurde, auf dem kragenartigen Gebilde auch noch einen Kranz stärkerer Wimpern.

Bei den ganz ausgestreckten Tieren umgibt die Pellicula den Leib vollständig glatt und faltenlos. Wenn das Tier sich ein wenig kontrahiert, so bildet die Pellicula eine Menge ganz feiner Querfalten (Textfig. A Nr. 1). Bei starker Kontraktion wölbt sich zwischen den Wimperstreifen die Oberfläche nach außen, so daß die Wimperreihen in Furchen verlaufen, die den Leib entlang ziehen. Gleichzeitig werden die Querfalten zwar geringer an Zahl, dafür aber noch viel stärker ausgeprägt, so daß der Raum zwischen je zwei Wimperreihen als ein Säulchen von hintereinanderliegenden viereckigen Kästchen erscheint. Textfig. A 2 zeigt die Pellicula eines mit Pikrinessigsäure fixierten und unter dem Deckglas zerquetschten Tieres. Man sieht dort, daß jedes solche Säulchen eine gewisse Selbständigkeit besitzt. Eines von diesen ist nämlich links mit seiner Wimpernreihe und der darunter liegenden Muskelfibrille in festem Zusammenhang, während auf der rechten Seite sich die Myofibrille abgelöst hat und einen zackigen Rand bildet.



Textfig. A.

Wie schon erwähnt wurde, besitzt *Tracheloccrca* eine auffallende Kontraktionsfähigkeit. Das Tier vermag sich augenblicklich auf $^1/_{12}$ seiner ursprünglichen Länge zu verkürzen. Diese Fähigkeit beruht

auf den in der Pelliculaschicht verlaufenden Muskelfibrillen. Mit völliger Bestimmtheit sind diese Fibrillen bei *Trachelocerca* bisher noch niemals beschrieben worden.

Ihr Bau folgt nicht vollständig dem von Bütschli und Schewiakoff gegebenen Schema. Die bekannten Kanälchen der Myofibrillen sind nämlich nicht vorhanden, weshalb auch die Differenzierung der Oberfläche des Tieres in Rippen und Zwischenstreifen nicht ausgeprägt ist.

Vielleicht ist gerade dieser Umstand die Ursache, daß Schewiakoff die Myofibrillen bei *Trachelocerca* nur vermutet, aber nicht für bewiesen hält. Doch sind sie in einigen Fällen ins Auge springend. Sie nehmen die Kernfarbstoffe bedeutend stärker als das umgebende Protoplasma an und lassen sich sehr gut differenzieren. Sie verlaufen unweit von den Reihen der Basalkörperchen und sind ebensogut auf Totalpräparaten, wie an den Längs- und Querschnitten zu konstatieren. Auch am Leben sind die Fibrillen sichtbar und bei etwas gepreßten Exemplaren kann man nicht selten folgende interessante Erscheinung beobachten: jede Fibrille kann sich ganz selbständig kontrahieren; man sieht deutlich, daß das Wirkungsfeld der Fibrille ausschließlich die nach rechts liegende Pelliculasäule ist. An Stellen, wo die Nachbarfibrille keine Kontraktion erlitten hat, kann man jedesmal feststellen, daß auch das dazu gehörige Säulchen nicht kontrahiert ist, Tatsachen, die mit den oben beschriebenen morphologischen Beobachtungen an gequetschten Tieren in bestem Einklang stehen.

Die Querschnitte (Taf. VII Fig. 12—13) lassen erkennen, daß die Myofibrillen nicht besonders tief in der Pelliculaschicht eingebettet sind. Die bei *Stentor*, *Condylostoma* und anderen Infusorien beschriebenen Kanälchen fehlen, wie schon erwähnt, in diesem Fall vollständig. Ich habe ganz verschiedene Fixierungsflüssigkeiten benutzt, auch die von Schröder empfohlenen Flemming'schen und Hermann'schen Gemische, aber das Resultat blieb immer negativ. Auch bei lebenden Tieren sieht man von Kanälchen nichts.

Taf. VII Fig. 11 zeigt, daß sehr oft die Myofibrillen eine rosenkranzförmige Gestalt haben. Schröder meint, daß solche Erscheinungen der Ausdruck schlechter Konservierung seien. In meinen Präparaten, die in bezug auf Plasmaerhaltung und Kernstruktur gar nicht schlecht sind, fand ich solche Anschwellungen immer bei den stark kontrahierten Exemplaren und an den am stärksten zusammengezogenen Stellen. Ich glaube deswegen, daß

diese Anschwellungen recht gut in einem direkten Zusammenhang mit der Kontraktion stehen können.

Die Verteilung der kontraktilen Elemente auf der Oberfläche des Leibes ist nicht überall die gleiche. Bei einigen Tieren sind auf der Rückenseite (das ist die Seite, welche der mit der Mundspalte versehenen Seite gegenüberliegt) die Fibrillen stärker entwickelt. Diese ungleiche Verteilung der kontraktilen Elemente findet ihren deutlichen Ausdruck bei stark kontrahierten Tieren, die stets infolge der dorsal überwiegenden Verkürzung eine sichelartige Form annehmen. Diese Erscheinung zeigt sich immer an solchen Formen, bei denen die Kerne zur Rückenseite gedrängt sind. Wir werden weiter sehen, daß es auch Tiere gibt, bei denen die Kerne ganz gleichmäßig verteilt sind. Es sind dann auch die Myofibrillen ganz gleichmäßig verteilt und während der Kontraktion biegen sich die Tiere beinahe gar nicht. Daher ist es vielleicht berechtigt anzunehmen, daß die Verteilung der Fibrillen zu der der Kerne in irgendwelcher Beziehung steht.

Es kommt auch vor, daß nicht jede Reihe von Wimpern neben sich eine Myofibrille hat. Auf Taf. VII Fig. 10 sehen wir, daß die Mehrzahl der Fibrillen sehr stark entwickelt, eine jedoch ganz schwach und kaum zu sehen ist. Es gibt sogar Fälle, wo auf ganz gleich angefertigten Präparaten von den Fibrillen nichts zu sehen ist.

Andererseits kommt es vor, daß nicht nur eine, sondern sogar zwei Arten von Fibrillen sich ganz sicher konstatieren lassen. Auf den Quer- und besonders auf den Längsschnitten sieht man eine zweite Fibrille, die parallel der ersten die Reihe der Basalkörperchen auf der anderen Seite begleitet. Taf. VII Fig. 11 zeigt solchen Fall, wo die Existenz der zweiten Fibrille gar keinem Zweifel unterliegen kann. Sie nimmt die Farbe bedeutend weniger an und sieht im Vergleich mit der anderen schlanker aus. Was für eine physiologische Bedeutung diese zweiten Fibrillen haben, ist mir nicht klar. Ich will auf diese Frage nicht eingehen, da sie nur mit Hilfe besonderer Experimente entschieden werden kann. Es mag sein, daß diese Fibrillen den von Neresheimer bei *Stentor* entdeckten, aber von seiten Schröder's bestimmt in Abrede gestellten „Neurophanen" vergleichbar sind. Oder sie sind wiederum echte Myofibrillen und man kann dann in ihnen lediglich den Ausdruck einer gewissen Unbeständigkeit in bezug auf Zahl und Verteilung der Myofibrillen bei *Trachelocerca* sehen.

Nach der Meinung Schewiakoff's und anderer finden sich direkt unter der Pelliculla die Trichocysten, aber nicht bei allen Exemplaren.

Mir ist es niemals gelnngen, mit voller Sicherheit Trichocysten aufznfinden.

In verhältnismäßig seltenen Fällen ist das Ectoplasma des Tieres vollständig durchsichtig; häufiger enthält es verschiedene Einschlüsse und gar nicht selten ist die Menge derselben eine enorme. Taf. VII Fig. 37 zeigt ein solches Tier, das nach dem Leben gezeichnet ist. In solchen Fällen sehen die Tiere vollständig undnrchsichtig aus.

Welchen Ursprnngs diese Einschlüsse sind, ist schwer zu sagen. Schewiakoff führt *Trachelocerca* als Infusor an, das, wie auch *Paramaecium*, besonders viele sogenannte „Excretionskörper" habe. Wie bekannt, glaubt er, daß die Excretionskörper unorganische Reste des Stoffwechsels sind, nämlich Kristalle von Calcinmphosphat [$Ca_3(PO_4)_2$ oder $Ca_2H_2(PO_4)_2$].

Es mag sein, daß solche Stoffe wirklich bei *Trachelocerca* vorhanden sind; sicher aber ist, daß außerdem Einschlüsse von ganz anderer Natur sich finden. Ein Teil von ihnen verschwindet bei der Behandlung mit Alkohol nnd kann infolgedessen in fertigen Präparaten nicht mehr konstatiert werden; ein anderer Teil jedoch bleibt erhalten und zeigt durch seine Färbbarkeit mit verschiedenen Farbstoffen seine organische Herkunft. Das Wahrscheinlichste ist, daß wir hier, wie überall bei Protozoen, Reservestoffe vor uns haben. Bei einem einzigen von mir beobachteten Encystierungsfalle konnte ich sehen, daß nach dem Ausschlüpfen die Menge der Einschlüsse bedeutend kleiner war, als vor der Encystierung.

Das Aussehen des Endoplasmas selbst ist in beträchtlichem Maße von den oben erwähnten Einschlüssen und der aufgenommenen Nahrung abhängig. Im allgemeinen kann man sagen, daß es von dem gleichen Charakter ist, wie z. B. bei *Trachelius* oder *Loxodes*, d. h. es zeigt zwischen den verschieden dicken Plasmasträngen mehr oder weniger grobe Vacnolen. Bei Formen mit großen Kernen (A- nnd B-Formen) erscheint das Endoplasma neben diesen Kernen auf der Rückenseite des Tieres bedeutend dichter. Bei schwanzlosen Formen sah ich nicht selten eine kontraktile Vacuole. Dagegen konnte ich eine solche bei geschwänzten Tieren niemals beobachten. In Fällen, wo die Vacuole vorhanden ist, ist ihr Kontraktionstempo ein sehr langsames.

Wie schon erwähnt wurde, sind die Angaben über die Kerne sehr spärlich und widersprechend. Die einkernige von Entz beschriebene *Trachelocerca*-Form ist von Gruber in Abrede gestellt worden. Er behauptet, daß *Trachelocerca* stets viele Kerne zeigt,

und hält die einkernigen Tiere, wenn sie wirklich existieren, für eine andere Art. Dazu kommt noch eine von Gruber entdeckte *Trachelocerca*-Form, bei der der Autor sogar überhaupt keine Kerne gesehen haben will nnd die er wieder als eine besondere Art, *Trachelocerca minor*, betrachtet.

Ich kann bestätigen, daß alle diese drei *Trachelocerca*-Formen wirklich vorkommen, und, wie ich glaube, kann ich auch beweisen, daß sie alle zu einer Art gehören und in genetischem Zusammenhange stehen.

Weil ich die verschiedenen Formen getrennt besprechen werde, scheint es mir bequemer, eine jede mit einem besonderen Buchstaben zu bezeichnen.

Mit dem Buchstaben „A“ möchte ich die einkernigen Tiere bezeichnen (Taf. VII Fig. 1). „B“ nenne ich die Tiere, die eine Menge ein- oder zweireihig angeordneter Kerne besitzen (Taf. VII Fig. 2—3).

Mit „C“ schließlich bezeichne ich die Tiere, die nach Gruber's Angaben keine Kerne haben, in Wirklichkeit sind auch in diesem Falle Kerne anwesend, nur ist ihre Struktur eine ganz abweichende.

Die Tatsache, daß Entz stets nur einkernige Tiere gesehen hat, Gruber im Gegenteil nur vielkernige, findet ihre Erklärung darin, daß gewöhnlich in einem Wasserbehälter sich alle Tiere zu gleicher Zeit in gleichem Zustand befinden.

Ich will dafür einige Beispiele anführen.

In einigen Seeaquarien in Moskau fand ich immer die einkernigen Tiere (A) und nur als eine überans seltene Ausnahme die Tiere „B“. In anderen Aquarien waren dagegen unsere Infusorien stets vielkernig (B), während ich niemals einkernige finden konnte.

Als ich an der zoologischen Station zu Sebastopol war, konnte ich meistens nur einkernige Tiere erhalten. Die mir von Prof. Cori aus Triest geschickten Gläser enthielten ausschließlich die Form „B“. Und schließlich zeigten die Kulturen, die ich im Dezember 1906 aus Wasser von Rovigno erzielt habe, in der ersten Zeit nur die Stadien „C“. Weil so jede Form eine große Selbständigkeit zeigt nnd besonders die Form „C“ von den anderen abweichende Merkmale aufweist, werde ich alle diese Tiere in bezug auf ihre Lebensprozesse getrennt behandeln.

Die Größe der Tiere schwankt außerordentlich. Wie ich schon hervorgehoben habe, können einzelne Exemplare bis $1^1/_2$ mm groß werden, während andere nur 0,1 mm messen.

Wie wir später sehen werden, entstehen solche kleinen Tiere aus dem Stadium „C“ und wachsen dann erst zu großen Tieren

heraus. Ich werde deswegen auch diese Formen bei der Beschreibung der „C“-Tiere eingehend besprechen; hier dagegen will ich hauptsächlich die größten nnd die mittleren einkernigen Formen betrachten.

Das erste, was bei diesen Formen besonders auffällt, ist die außerordentlich geringe Masse der Kernsubstanz nnd speziell des Chromatins im Vergleich zu der ganzen Zelle.

Der Kern des *Trachelocerca* liegt gewöhnlich in der Mitte des Zelleibes gegen die Rückenseite zn. Sein Kern ist gar nicht dem der meisten Infusorienkerne entsprechend. Er hat vielleicht die größte Ähnlichkeit mit den Kernen einiger Acineten (*Dendrocometes*), bei denen das Chromatin in der Form feiner Körner ins Stroma des Kernes eingebettet ist.

Die Grundsubstanz des *Trachelocerca*-Kerns kann ganz verschieden anssehen. Bald ist sie fast homogen, bald vacuolisiert. Eine Kernmembran ist gewöhnlich vorhanden, aber ihre Dicke kann variieren.

In den meisten Fällen ist die Grundsubstanz dicht von einer Menge verschiedener großer Chromatinkörner erfüllt. Zwar ist Zahl und Größe dieser Körner gar nicht konstant. Ihr Aussehen jedoch ist stets das gleiche. Irgend ein, dem Micronucleus der übrigen Infusorien entsprechendes Gebilde, ist nicht vorhanden. Diesem sehr wichtigen Punkte habe ich besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Wären Micronuclei vorhanden, so müßte man sie bei diesen einkernigen Tieren am leichtesten finden. Doch auch mit ganz verschiedenen Methoden der Konservierung und Färbung konnte ich an Totalpräparaten so wenig wie auf Schnittserien irgendwelche differenzierte Gebilde finden, weder im Plasma, noch im Kerne selbst.

Taf. VII Fig. 14 zeigt einen solchen mit Körnchen erfüllten Kern, den wir als Ausgangsstadium einer, wie wir später sehen werden, stattfindenden Zerstückelung ansehen können. Solche Kernformen sind ziemlich selten.

Viel öfter findet man der Taf. VII Fig. 15 entsprechende Kerne, bei denen sich im Innern schon eine verschieden große Anzahl dicht nebeneinander liegender Blasen zeigt. In bezug auf alles andere ist ihr Bau mit dem der bisher besprochenen Kerne ganz identisch.

Wodnrch dieser Zerfall des Kernes bewirkt wird, ist schwer zn sagen. Doch kann man alle Übergänge finden, von Kernen, wo (Taf. VII Fig. 15) die Blasen sich noch sehr schwer unterscheiden lassen nnd dicht nebeneinander liegen, bis zu Stadien (Taf. VII Fig. 16 und 17), wo die Blasen als verkleinerte Kopien des Kerns

erscheinen und ganz locker zu einem morulaähnlichen Körper vereinigt im Plasma des Tieres liegen. Schließlich können so entstandene Haufen auseinandergehen und sich in eine oder zwei Reihen längs der Rückenseite des Tieres anordnen. Auf solche Weise können wir von ganz typischen einkernigen Tieren eine ununterbrochene Kette von Übergängen zu den „B"-Formen feststellen.

Neben diesen, man kann sagen äußerlichen Veränderungen des Kernes, können auch Veränderungen der Struktur und Umlagerungen der chromatischen Substanz vor sich gehen.

Doch sind diese Prozesse der Formen „A" vollständig ähnlich denen bei den Tieren „B". Bei den letzteren konnte ich die Erscheinung viel genauer verfolgen und zeitlich festlegen als das bei einkernigen Formen mir möglich war. Hier in München habe ich nämlich im lebenden Zustande nur ausnahmsweise die Tiere „A" gehabt. Infolgedessen ziehe ich vor, alle inneren Kernveränderungen bei den Tieren „B" zuerst zu beschreiben, um dann später die in dieser Beziehung vollständige Übereinstimmung zwischen beiden Formen betonen zu können.

Als eine physiologische Eigentümlichkeit der Formen „A" ist ihre besonders stark ausgeprägte Kontraktionsfähigkeit hervorzuheben.

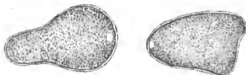
Wie ich früher in Moskau beobachtet habe, können die Tiere in einkernigem Zustand sehr lange Zeit existieren, ohne sich in die Form „B" umzuwandeln. Leider, wie gesagt, habe ich keine Möglichkeit mehr gehabt, reiches einkerniges Material zu bekommen. Infolgedessen sind meine Kenntnisse von diesen Entwicklungszuständen von *Trachelocerca*-Tieren lückenhaft, so z. B. was ihre Teilung betrifft.

Entz behauptet, die Teilung gehe in encystiertem Zustande vor sich. Es gelang mir auch einmal, diese Erscheinung zu beobachten.

Am 2. Februar hatte ich in einer Uhrschale ein sehr großes einkerniges Tier isoliert. Am folgenden Tage sah ich, daß es unverändert war, nur die Menge der „Excretionskörperchen" hatte zugenommen. Infolgedessen war das Tier noch undurchsichtiger geworden. Am 4. fand ich in der Kultur eine Cyste, die schon zwei geteilte Tiere in sich enthielt (Taf. VII Fig. 18). Die Cyste war von einer dünnen Membran umgeben, die an der Grenze zwischen beiden Teilprodukten besonders deutlich zu sehen war.

Die Tiere selbst hatten äußerlich keine Veränderungen erlitten, und wie früher waren sie vollständig mit den Einschlüssen erfüllt, so daß die Kerne damit völlig verdeckt waren.

Am 5. morgens habe ich anstatt der Cyste nur die Reste der Membran gefunden. Später suchte ich auch die Tiere selbst heraus. Sie waren wieder encystiert, aber jedes allein. Der Abstand zwischen beiden Cysten war mehr als ein Zentimeter. Die Cysten waren nicht vollständig rund, sondern, wie Textfigur B zeigt, hatte die eine eine birnförmige Gestalt und stak mit ihrem dünnen Ende im Schlamm. Die andere Cyste war mehr abgerundet. In jeder fand ich eine Vacuole.



Textfig. B.

Lange Zeit beobachtete ich die Cyste, aber nie gelang es mir, die Entstehung der Vacuole zu sehen. Doch aus dem Umstand, daß die Cysten bald die Vacuole besaßen, bald nicht, ziehe ich den Schluß, daß die Vacuole zwar kontraktil war, aber nur sehr langsam pulsierte.

Später fand ich beide Cysten ganz rund, mit einer ziemlich dicken Hülle versehen. An den folgenden Tagen, bis zum 16. traten keine Veränderungen ein.

Nach dem 16. habe ich eine Cyste gefunden, die wieder an den Zustand von Textfigur B erinnerte. Die Hülle war sehr dünn. Das Gebilde wurde in einem Uhrglas mit frischem Seewasser isoliert und nach 2 Stunden ungefähr fand ich anstatt der Cyste einen zarten Organismus, der im Aussehen von *Trachelocerca* sehr abwich. Einige Zeit habe ich das Tier beobachtet, am folgenden Tag aber verschwand es wieder und an seiner Stelle erschien in der Uhrschale wieder ein cystenartiges Gebilde.

Das Wechseln des Wassers hatte wieder zur Folge, daß nach einer Stunde das Tier frei umherschwamm. Leider ging es bei dem Versuch, es in ein anderes Glas zu übertragen, zugrunde.

Es ist sicher, daß diese so rasch aufeinanderfolgenden Encystierungen keine normalen Vorgänge waren. Vielmehr macht es ganz den Eindruck, daß hier als bestimmender Faktor die Seewasserkonzentration anzusehen ist. Während der Beobachtung blieb die Uhrschale natürlich unbedeckt, und bei der kleinen Wassermenge konnte in dieser Zeit die Konzentration bedeutend steigen. Die

Richtigkeit dieser Vermutung verbürgen auch die Vorgänge in der anderen Cyste.

Einmal fand ich sie ganz rund, mit einer dünnen Hülse umgeben. Nach dem Zugießen frischen Wassers merkte ich, daß im Innern der Cyste das Tier zu rotieren anfing. Das Wasser wurde noch einmal umgewechselt, und nach kurzer Zeit konnte ich unter dem Mikroskop den ganzen Prozeß des Ausschlüpfens verfolgen.

Nach der ziemlich lange dauernden Rotation des Tieres in der Cyste wurde ihre Membran an einer Stelle plötzlich gesprengt, und durch die so entstandene Öffnung begann das Tier sein Vorderende aus der Cyste herauszustrecken. Die Mundöffnung sah ich nicht, aber der Kranz von stärkeren Wimpern war schon vorhanden. Das Vorderende war ganz frei von irgendwelchen Einschlüssen, während der übrige Teil des Leibes stark davon erfüllt war (Textfig. C).

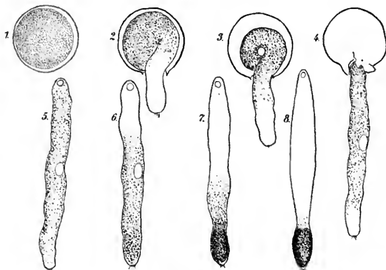
Bei dem nun folgenden Ausschlüpfen konnte man sehen, wie diese Körnchen von dem hinteren nach dem vorderen Ende überwanderten. Dabei gab es ein Stadium (Textfig. C, 4 u. 5), wo ihre Verteilung mehr oder weniger gleichmäßig war, und zu dieser Zeit konnte man sicher den ungefähr im Centrum liegenden Kern sehen.

Das Überwandern der Körnchen geschah so schnell, daß schon nach wenigen Minuten sich alle, mit wenigen Ausnahmen, in dem Köpfchen zu einer dichten Masse angesammelt hatten. Auf diese Weise war der ganze Leib durchsichtig geworden und der Kern ließ sich wieder vom umgehenden Plasma nicht unterscheiden. Am hinteren Pole fand sich die bis jetzt noch nicht bemerkbare kontraktile Vacuole (Textfig. C 5—8). In diesem Zustand unterscheidet sich das Tier sehr wesentlich von der normalen *Trachelocerca*, es stimmte aber mit dem in der ersten zugrunde gegangenen Cyste beobachteten Tiere überein.

Andererseits lassen sich gewisse einkernige Formen, vermöge ihrer Gestalt von solchen frisch ausgeschlüpften Tieren ableiten. Ich habe nämlich manchmal freischwimmende Tiere gesehen, die ein ziemlich großes, stark pigmentiertes Köpfchen besaßen, dagegen war ihr Leib länger und schlanker, und anstatt eines abgerundeten Endes hatten sie einen spitz auslaufenden Schwanz ohne Vacuole. Sehr interessant ist es, daß das Vorhandensein der Vacuole und das Fehlen des Schwanzes ständig Merkmale der Formen „C“ darstellen.

Leider gelang es mir, wie mit dem ersten, so auch mit dem zweiten ausgeschlüpften Tier nicht, es weiter zu züchten. Nach einigen Tagen konnte ich es nicht mehr finden; wahrscheinlich war es auch zugrunde gegangen.

Kehren wir jetzt zur Frage der Vermehrung von *Trachelocerca* zurück. Wie aus dem eben Beschriebenen hervorgeht, kann ich die Beobachtungen von ENTZ, daß das Tier im encystierten Zustand sich zu teilen vermag, bestätigen. Aber es scheint mir nicht bewiesen zu sein, daß die Teilung in der Cyste der einzige Teilungsmodus der einkernigen Tiere ist. Man kann das nämliche aus dem Teilungsvorgang der „B"- und „C"-Stadien schließen. Wenn ENTZ aus der Tatsache, daß *Trachelocerca* zu den Enchelliden gehört, die Forderung ableitet, daß es sich nur im Cystenzustand teilen könne, so halte ich diesen Schluß für ganz verfehlt.



Textfig. C.

Wie die Teilung des Kernes bei „A"-Tieren vor sich geht, ist mir auch nicht ganz verständlich geworden. Es ist möglich, daß der Kern einfach in 2 Körper zerfällt, und daß darauf die Teilung des Tieres folgt, so daß jedes Tochterindividuum einen Kern bekommt. Dafür spricht z. B. das auf Taf. VII Fig. 19 abgebildete Tier mit zwei Kernen. Doch ist das natürlich nur eine Vermutung.

Wie ich einmal schon erwähnt habe, verwandeln sich durch den Zerfall des Kernes in eine Anzahl Blasen und durch das Auseinanderweichen dieser Blasen die einkernigen Tiere in vielkernige „B"-Formen.

Die Zahl der so entstandenen Blasen ist nicht groß. Sie schwankt gewöhnlich zwischen 4—20. Doch kann später durch weitere Vermehrung eine viel größere Anzahl entstehen. Daher trifft man zwischen solchen „B"-Tieren Exemplare mit 60 - 80 Kernen. Seltener findet man die Tiere nur mit 3 oder 4, am häufigsten mit 20—50 Kernen. Die Größe kann, wenn auch nicht so wie im ersten Falle, doch ziemlich bedeutend variieren. In der Regel zeigen die größeren Exemplare die größere Zahl der Kerne und umgekehrt.

Gewöhnlich unterscheiden sich diese Kerne in ihrem Bau nicht von solchen der Tiere „A". Wie im ersten Falle kann man nirgends etwas an einen Micronucleus erinnerndes finden. Wie im ersten Falle besteht der Kern aus Grundsubstanz und in diese eingebetteten Chromatinkörnchen; nur ist die Zahl der Körnchen gewöhnlich nicht so groß. Es gibt sogar Fälle, wo sie ganz gering ist (1—4): dann ist die Grundsubstanz besser zu erkennen und zu untersuchen. Die Membran kann wie bei den Tieren „A" ganz verschieden scharf ausgeprägt sein.

Die Vermehrung der Kerne geschieht auf sehr einfache Weise. Der zuerst kugelige Kern nimmt eine ovale Gestalt an und zerfällt in zwei meist nicht gleich große Blasen (Taf. VII Fig. 20) die anfangs dicht beieinander liegen, dann aber auseinander rücken. Der Vorgang ist also im Prinzip der gleiche wie bei den Tieren „A".

Die Chromatinkörnchen vermehren sich, wie es scheint, durch eine Art Teilung. Es kommt nämlich nicht selten vor, daß zwei solche im Kerne liegende Körnchen durch einen eigentümlichen Strang miteinander verbunden sind. Die Stränge können verschieden lang sein und färben sich viel schwächer als die Körnchen selbst (Taf. VII Fig. 20—21). Ich glaube, daß solche Bilder nur als Teilungsstadien gedeutet werden können.

Die Tiere mit einem solchen Kernapparat, die wir mit „B" bezeichnet haben, können monatelang existieren; in den anfangs April aus Rovigno erhaltenen Kulturen habe ich bis September genug Material davon gehabt. Sie vermehrten sich enorm und zeigten gleichzeitig in ihren Kernen eine Reihe sehr interessanter Erscheinungen.

In betreff der Teilung kann ich mit völliger Sicherheit behaupten, daß sie bei freischwimmenden Tieren vorkommt und in einer einfachen Querdurchschnürung besteht.

Obwohl der Teilungsvorgang ziemlich langsam vor sich geht, gelang es nicht oft, ihn zu sehen. Da ich keine Uhrgläserkulturen besaß, mußte ich die in Teilung begriffenen Tiere aus den Stamm-

knlturen heraussnchen. In langgestrecktem Zustand sind die ersten Stadien der Teilung sehr leicht zu übersehen, oder mit Deformationserscheinungen des Körpers durch Nahrungspartikelchen zu verwechseln. Die fortgeschrittenen Stadien aber mit der Pipette herauszunehmen, ist schwer, weil es sehr oft vorkommt, daß dabei die dünne, protoplasmatische Brücke zerrissen wird. Indessen habe ich doch genügende Gelegenheit gehabt, am lebenden Tiere und an den Präparaten die Teilung zu studieren. Gewöhnlich sind die Tochtertiere in bezug auf Größe und Zahl der Kerne nicht vollständig gleich. In den meisten Fällen ist das vordere Tier, das mit dem Mund versehen ist, ein wenig größer als das hintere. Die Vermehrung der Kerne und ihre Zahl steht in keinem direkten Zusammenhang mit dem Teilungsvorgang des Tieres selbst. Die Verteilung der Kerne ist ganz willkürlich nnd geschieht auf ähnliche Weise wie z. B. bei *Opalina*. Auch ihre inneren Veränderungen, die wir noch besprechen werden, haben keinen besonderen Einfluß auf die Teilung.

Taf. VII Fig. 39 zeigt verschiedene Stadien des Prozesses von demselben Tier nach dem Leben gezeichnet. Der Zeitraum vom Moment, wo ich das in Teilung begriffene Tier fand, bis zu der völligen Trennung beider, ist ziemlich groß, nämlich 1 Stunde 10 Minuten.

Schon anfangs zeigten die beiden noch zusammenhängenden Teilprodukte in ihrer Bewegung ziemlich große Unabhängigkeit voneinander. Besonders in den letzten Momenten bekam man den Eindruck, als ob der ganze Vorgang den Zweck habe, die beiden Tiere voneinander loszulösen. Interessant war das, wie der letzte ungemein feine protoplasmatische Verbindungsstrang durch eine gleichzeitige Kontraktion beider Tiere zerrissen wurde.

Da in dieser Zeit bei dem hinteren Tiere noch keine Spuren des Mundapparates angelegt waren, so stellte sich der Teilungsvorgang als eine einfache qnere Durchschnürung dar. Nur in der Tatsache, daß das künftige Vorderende des hinteren Tieres nicht gerade, sondern schräg abgeschnitten wird, haben wir einen Hinweis auf den späteren Mundapparat zu sehen. Wie dessen Ausbildung vor sich geht, konnte ich leider nicht untersuchen, doch ist er nach 2—3 Stunden schon fertig.

Wie bereits gesagt wurde, können die Tiere sehr lange Zeit in Knlturen leben, ohne äußerlich irgendwelche Veränderungen zu zeigen. Doch im Innern, nämlich an den Kernen, gehen einige Erscheinungen vor sich, die schließlich zur Conjugation der Tiere führen.

Die Prozesse erscheinen in ihrer Gesamtheit auf den ersten Blick sehr kompliziert und unverständlich; doch werden sie sofort ganz klar, wenn wir sie nach den Gesichtspunkten R. Hertwig's betrachten.

In seiner bekannten Arbeit „Über physiologische Degeneration bei *Actinosphaerium eichhorni*“ führt R. Hertwig die Anschanung durch, daß in der Zelle infolge ihrer Lebensfunktion die Chromatinsubstanz der Kerne im Vergleich zu der Plasmamasse allmählich zunimmt. Dadurch wird die für geregelte Lebenstätigkeit erforderliche normale Kernplasmarelation gestört, nnd die Zelle tritt in einen Depressionszustand ein.

Ferner ist R. Hertwig zn der Anschauung gekommen, daß der Befruchtungsvorgang eines von den Mitteln ist, das verlorene Gleichgewicht der Zelle wieder herzustellen, oder, mit anderen Worten, er hat die Tatsache festgestellt, daß der Zustand der Zelle vor der Befruchtung ein mehr oder weniger starker Depressionszustand ist, der durch dieselbe anfgehoben wird.

Die gleichen Ansichten hat auch M. Popoff in einer Arbeit „Depression der Protozoenzelle und der Geschlechtszellen der Metazoen“ geäußert und auffallend klar die Richtigkeit der Theorie für die Infusorien *Stychlonychia* und *Paramaecium* bewiesen.

Ein solcher Standpunkt gibt uns den Schlüssel zum Verständnis anch der in den Kerneu von *Trachelocerca* sich abspielenden Prozesse, die besonders interessant sind, weil hier die Differenzierung in Macro- nnd Micronuclei noch nicht vorhanden ist.

Die mit der Zeit eintretende Vermehrung des Chromatins findet in nnserem Falle ihren ersten Ausdruck in der Vergrößerung von Zahl und Volumen der Chromatinkörnchen. Ferner uimmt die Fähigkeit, basische Farbstoffe anzunehmen, bedeutend zu. Schließlich findet innerhalb des Kernes eine Ausscheidung des Chromatins aus den einzelnen Körnchen statt.

Offenbar findet sich, wie das R. Hertwig für *Actinosphaerium* annimmt, nnd wie es in vielen Fällen sicher richtig ist, bei *Trachelocerca* das Chromatin der Körnchen in Verbindung mit Nucleolarsubstanz. Erst jetzt, nach der Vermehrung der chromatischen Substanz, wird es in reinem Zustand ausgeschieden.

Die so entstaudenen Bilder zeigen zuweilen eine auffallende Ähnlichkeit mit den Bildern der Chromatinausscheidung aus den Nucleolen bei *Actinosphaerium* während der Bildung sogenannter Riesenkerne. Ich empfehle nur die Abbildungen von Hertwig Taf. XI Fig. 7 und meine Taf. VII Fig. 23, 33 zn vergleichen.

Wie bei *Actinosphaerium* kann man auch in solchen Fällen keine Regelmäßigkeit des Vorgangs feststellen. In ihren Einzelheiten ist die Erscheinnng sehr verschiedenartig. Das ausschlaggebende Moment ist hier die Zahl und die Form der chromatischen Körnchen, aus denen das Chromatin heraustritt. Den Veränderungen dieser Faktoren entsprechen auch die des Gesamtbildes (Taf. VII Fig. 23—28). Bald wird das Chromatin als eine mehr oder weniger kompakte Masse, bald als ganz feine Körnchen ausgeschieden. In den meisten Fällen sammelt es sich als eine Brücke zwischen zwei nebeneinander liegenden Körnern. Zuweilen scheidet ein großes Chromatinkorn ein oder auch mehrere Kügelchen von znsammengedrängter chromatischer Snbstanz aus (Taf. VII Fig. 23, 24, 25, 27). In anderen Fällen vereinigen sich die ausgeschiedenen Massen zwischen 3 oder 4 Körnern zu einer einzigen (Taf. VII Fig. 26).

Die so entstandenen Inseln von chromatischer Substanz fließen nnn gewöhnlich in eine Masse zusammen und rücken an die Oberfläche des Kernes (Taf. VII Taf. 30). Zunächst folgt nun wohl das seltener beobachtete Stadium (Taf. VII Fig. 29), wo das ganze ansgeschiedene Chromatin noch ziemlich gelockert die Oberfläche des Kernbläschens zum großen Teil überzieht. Allmählich wird diese Anhäufung dichter, und schließlich legt sie sich als eine kleine, aber auffallend stark färbbare Kappe irgendwo der Oberfläche an.

Die nach dem Heraustreten des Chromatins ganz blaß gewordene Nucleolarsnbstanz fließt nun meist in eine oder zwei größere Ansammlungen zusammen.

Merkwürdigerweise ist beinahe jeder Kern zu dieser Zeit in 4 meistens gleich große Blasen (Kerne) zerfallen, nämlich in 2 größere nnd 2 kleinere. In jedem von diesen Kernen gehen die oben beschriebenen Prozesse ganz selbständig vor sich, aber später, nach der Bildnng der vier, oder mehr, chromatischen Kappen (Taf. VII Fig. 30) fließen diese letzteren in zwei zusammen, und es entstehen auf solche Weise als am häufigsten anftretende Bilder: 4 nngleich große Kerne nnd zwischen ihnen zwei stark chromatische Gebilde (Taf. VII Fig. 32). Doch ist diese Erscheinung nicht immer zu beobachten.

Von diesen 4 Kernen unterscheiden sich die 2 kleineren auf den ersten Blick nicht von den größeren; in Wirklichkeit haben sie jedoch einige Besonderheiten. Manchmal (Taf. VII Fig. 31) zeigen sie eine fibrilläre Struktur nnd bei der Conjugation werden sie viel schueller resorbiert, als die großen Kerne.

Anffallend an den Kernen ist die häufige Anwesenheit eigen-

tümlicher Kristalle, (Taf. VII Fig. 30—32) eine Erscheinung, die wir als nicht hierher gehörig später besprechen werden.

Nach der oben beschriebenen chromatischen Ausscheidung können wir die Tiere als reif für den Conjugationsvorgang betrachten. Aber in solchem Zustand kommen die vegetativen Funktionen der Tiere nicht zum Stillstand, diese nehmen Nahrung auf und können durch die oben beschriebene Querteilung sich vermehren. Ob die Kerne mit den neuentstandenen chromatischen Gebilden sich noch zu teilen vermögen, ist eine offene Frage.

Den Conjugationsvorgang selbst kann ich leider nur in seinen hauptsächlichsten Etappen schildern, weil mein Material für die Beantwortung dieser Frage zu spärlich war.

Das Mittel, die Tiere künstlich zur Conjugation zu veranlassen, wie es Prandtl für *Didinium* oder Popoff für *Carchesium* angewandt haben, ist bei mir wegen der Schwierigkeiten der Kultivierung wirkungslos geblieben.

Alles was ich über diesen Gegenstand bringen kann, bot sich mir zufällig in einer Stammkultur. Ich halte es für beachtenswert, daß, ungeachtet meiner resultatlosen Experimente, die Bedingungen, bei welchen die Conjugation in der Stammkultur eingetroffen ist, vollständig den theoretischen Forderungen entsprechen. Nämlich alle Conjuganten habe ich in einem Glas gefunden, das lange Zeit sehr reichlich mit Nahrungsmaterial versehen worden war. Nach einer Periode gemäßigter Temperatur traten im Mai plötzlich sehr heiße Tage ein, so daß die ganze Woche hindurch das Thermometer des Laboratoriumszimmers mehr als 25° C im Schatten zeigte. Infolgedessen vermehrten sich die Tiere ganz enorm und die Nahrungsmenge nahm ab.

Zu dieser Zeit konnte man nicht selten sehen, daß die Tiere hier und dort an den Glaswänden in großen Haufen sich sammelten (Textfig. D). Manchmal fand man 50—60 Tiere in einem Knäuel. Zwar ist es wohl denkbar, daß eine solche Erscheinung durch lokale Ansammlung von Nahrungspartikelchen hervorgerufen wurde, doch muß ich darauf aufmerksam machen, daß alle Conjuganten, die ich habe, mittels der Lupe in solchen Ansammlungen gefunden wurden.[1])

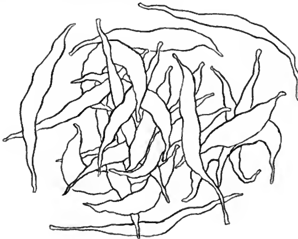
Es conjugieren gewöhnlich nicht besonders große Tiere und es kommt nicht selten vor, daß die Größe der Conjuganten etwas ver-

[1]) Auch bei Dilepten kann man eine ähnliche Erscheinung beobachten. Wie bei *Trachelocerca* findet man die conjugierenden Tiere stets in solchen Häufchen liegen.

schieden ist; ebenso kann auch die Zahl der Kerne eine ungleiche sein.

Während der Conjugation verbinden sich die Tiere der Länge nach mit den Bauchseiten. Nur der Kopf und der Schwanz bleiben noch frei (Taf. VII Fig. 41—42). Wie es scheint, bleibt die Pellicula an der Berührungsstelle erhalten und bildet bei kontrahierten Formen eine zickzackförmige Linie (Taf. VIII Fig. 45).

Der ganze Vorgang dauert ungefähr 24 Stunden; ganz genau konnte ich die Zeit nicht feststellen.



Textfig. D.

Zu Anfang bleibt die Verteilung der Kerne in den Körpern der Infusorien noch ungestört. Die erste Veränderung an den Kernen selbst besteht darin, daß die stark färbbaren chromatischen Gebilde, die bis jetzt mit den Kernen noch verbunden waren, sich lösen und selbständig werden, wenn sie auch noch zwischen den Kernen liegen.

Wieder ein wenig später finden wir diese Gebilde, die nach der Rolle, die sie spielen, mit dem Micronucleus typischer Infusorien zu vergleichen sind, mit einem hellen Hof umgeben. Wahrscheinlich ist dieser Hof der Ausdruck einer Membran. Dort, wo zwei solche „propagatorische" Kerne beisammen liegen, erscheinen die Hüllen dicht aneinander gedrängt (Taf. VIII Fig. 43 rechts).[1])

[1]) Die Kerne des linken von den auf Fig. 43 abgebildeten Tieren möchte ich für nicht ganz normal ansehen. Die typischen vierkernigen Gruppen sind hier nicht vorhanden, und an ihrer Stelle sehen wir, daß die kleinen Kerne eine

Mit dem Fortschreiten des Vorganges nähern sich die Kerne einander und gleichzeitig wandeln sich die „propagatorischen Kerne“ ans ganz kompakten Gebilden in Blasen mit sehr dentlicher Wabenstruktur nm (Taf. VIII Fig. 44). Die kleineren Kerne sind zu dieser Zeit schon blaß geworden; sicher erleiden sie eine Resorption. Die größeren aber sehen normal aus.

Das folgende Stadium der Conjngation, das ich beobachten konnte, gehört leider schon dem Ende des Vorganges an. Gerade an dieser Stelle ist der Mangel an Material besonders fühlbar geworden, und ich kann deswegen den Verlanf nicht mit völliger Sicherheit darstellen.

Es haben sich jetzt alle Kerne in den beiden Tieren zu je einem großen Hanfen gesammelt und im Centrum des Infusorienleibes einander gegenüber angeordnet (Taf. VII Fig. 42, Taf. VIII Fig. 45).

Die Kerne sind mit dichterem Protoplasma umgeben, das Stränge bildet, die zu der Berührungsstelle beider Tiere laufen, so daß ein Bild entsteht, als wollte das Plasma eines jeden Tieres in den Conjuganten überwandern.

Die Kerne und das sie umgebende dichtere Protoplasma bilden ein sehr scharf begrenztes viereckiges Feld. Auf den der Rückenseite des Tieres genäherten Rändern liegen ganz dicht nebeneinander die großen Kerne, deren Strnktur noch nicht verändert ist. Bei aufmerksamer Betrachtung findet man in der Nähe der Grenzlinie zu die Reste der kleineren Kerne. Diese sind noch blasser geworden und lassen sich nnr mit Mühe erkennen. Zwischen den großen Kernen und den Resten der kleinen liegen in jedem Tiere die Geschlechtskerne.

Das Aussehen der letzteren kann sehr verschieden sein. An Taf. VIII Fig. 45 auf der rechten Seite sehen wir chromatische Massen, die sich sehr intensiv färben und ganz an die in Fig. 44 abgebildeten wabigen Körper erinnern. Sie unterscheiden sich aber von ihnen, indem sie nicht scharf umgrenzt sind und den Eindruck

---

fibrilläre Strnktnr angenommen haben. Sie sind mit dem micronnclensartigen Gebilde fest verbnnden nnd können, wie Fig. 43 zeigt, ziemlich weit von der Kernseite entfernt liegen. Das Anssehen solcher Kerne ist mit dem auf Taf. VII Fig. 31 abgebildeten völlig identisch. Da ich solche Bilder bei nicht conjngierenden Tieren nicht selten gesehen habe, und dabei Abtrennung und allmähliche Resorption dnrch das Plasma beobachtete, sehe ich diese Stadien als Degenerationserscheinungen solcher Tiere an, die zur Conjngation schon reif waren, aber dnrch irgendwelche Ursachen verhindert wurden, sie durchzuführen.

erwecken, als ob ihr Chromatin sich verteilen und sie selbst zugrunde gehen wollten. Außer diesen degenerierenden Elementen findet sich noch eine Anzahl kompakter Körper von sehr verschiedener Größe. Im linken Conjnganten, wo die Menge der zugrunde gehenden Körper gering ist, ist dementsprechend die Zahl der letzteren kompakten Elemente besonders groß.

Die Größe der verschiedenen Formen wechselt sehr und wir können deswegen anf Taf. VIII Fig. 45 leicht alle Übergänge von den kleinsten Körnchen bis zu großen degenerierenden Massen finden.

Es kommt nicht selten vor, daß solche kleine Elemente paarig beieinander liegen nnd bei aufmerksamer Betrachtnng kann man dann zwischen ihnen eine Spindel wahrnehmen. Taf. VIII Fig. 47 zeigt solche Bilder in stärkerer Vergrößerung von einem anderen Präparat. An Taf. VIII Fig. 45 sehen wir, daß zwei Paar von solchen Kernen quer über der hier aufgelösten Pellicula liegen und so Austauschspindeln bilden. Auf Taf. VIII Fig. 46 sind sie sehr stark vergrößert dargestellt.

Wie schon gesagt wurde, läßt der Mangel an Übergängen zwischen den Stadien der Taf. VIII Fig. 44 u. 45 nicht mit völliger Sicherheit die Entwicklung der Befruchtungskerne verfolgen. Doch schon der Vergleich der beiden Stadien gestattet die sichere Behauptung, daß die Befruchtungskerne weder aus den großen noch ans den kleinen Kernen entstanden sein können, weil nach dem Erscheinen der fraglichen Kerne der Charakter der beiden übrigen Kernsorten noch ganz der gleiche ist. Schon dieser Umstand allein, ganz abgesehen von der Anwesenheit aller Übergänge zwischen den kompakten kleinen und den größeren lockeren Elementen spricht dafür, daß die Befruchtungskerne ihren Ursprnng von den wabenartigen Gebilden (Taf. VIII Fig. 44) respektive von den stark färbbaren chromatischen Ansammlungen (Taf. VII Fig. 31) nehmen.

Die so auffallende Mannigfaltigkeit im Aussehen der Geschlechtskerne kann man, wie mir scheint, durch den Vergleich mit dem Conjngationsvorgang der anderen Infnsorien erklären. Es ist eine wohlbekannte Tatsache, daß die Zahl der Micronucleen zur Zeit der Conjngation zunimmt. Die Literaturangaben über die Infusorien, die stets mehr als einen Micronucleus besitzen, sind zwar nicht zahlreich. Von MAUPAS' Angaben abgesehen, haben wir eine Arbeit von PROWAZECK (1903) über Conjugation bei *Bursaria truncatella.* Aber das, was hier PROWAZECK festgestellt hat, gibt nns die Möglichkeit, auch die Verhältnisse bei *Trachelocerca* zu klären.

PROWAZECK glaubt nämlich bewiesen zu haben, daß die normaler-

weise 15—16 zählenden Micronuclei beim Eintritt der Conjngation sich sehr rasch zu vermehren anfangen, und so einer Menge von Micronncleen (50—60 St.) den Ursprung geben. Aber auch in diesem Falle, wie offenbar überall bei den Infusorien, führt nur ein einziger Micronucleus den Befruchtungsvorgang durch.

Wenn wir die Erscheinungen während der Conjugation von *Trachelocerca* denen bei *Bursaria* vergleichen wollen, dann können wir es für sehr wohl möglich halten, daß in den bei mir fehlenden Stadien, wahrscheinlich auf mitotische Weise ein Teilungsvorgang der wabigen Blasen stattgefunden hat. Nicht alle daraus hervorgegangenen Kerne setzen die Teilung fort, sondern eine Anzahl von ihnen beginnt resorbiert zu werden, und, weil dieser Teilungs- und Degenerationsvorgang sich noch öfter wiederholt, wird es uns möglich, die verschiedenen Stadien auf Taf. VIII Fig. 45, 47 zu erklären.

Diese auf den ersten Blick so komplizierte Erscheinung spricht nicht gegen die primitive Natur des Tieres, vielmehr steht sie, wie wir sehen werden, in bestem Einklang mit ihr.

Daß die Caryogamie auch in diesem Falle nur zwischen zwei Kernen stattfindet, kann ich ziemlich sicher annehmen.

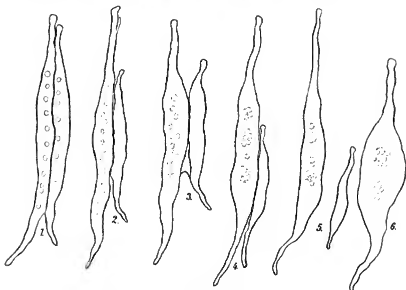
In einigen Exconjuganten gelang es mir, 1—2 Tage nach der Trennung, außer alten zugrundegehenden Kernen noch ein in der Nähe der Pellicula liegendes starkfärbbares Körnchen zu finden, dessen Größe und Aussehen den Eindruck machte, als ob es das Produkt der Befruchtungskernverschmelzung sei. Leider ließen die Exconjuganten sich nicht weiter züchten. Nur einmal habe ich ein Tier gehabt, das erst am vierten Tage fixiert worden ist. Taf. VIII Fig. 48 stellt seine Kerne dar. Von kleineren Kernen finden wir keine Spur mehr; auch die größeren zeigen sicher eine Degeneration, die der der kleineren entspricht. Außerdem finden wir auch die Reste der degenerierten Micronucleen, und schließlich noch zwei eigenartige Spindeln. Eine von diesen ist auf Taf. VIII Fig. 49 sehr stark vergrößert abgebildet und weist sogar in sich eine Menge von ganz kleinen, punktartigen Chromosomen auf.

Das weitere Schicksal der Exconjuganten direkt zu verfolgen, gelang mir nicht. Aber in demselben Glas, wo die Conjuganten aufgetreten waren, fand ich $1\frac{1}{2}$—2 Wochen später Tiere, wie ich sie früher niemals zu sehen bekommen hatte.

Auf Taf. VIII Fig. 50 ist ein solches Tier abgebildet. Wir sehen die alten, großen Kerne schon sehr weit degeneriert, so weit, daß sie schon beinahe keine Farbe mehr aufnehmen. Außer diesen

Kernen aber ist noch eine große Menge ganz kleiner Körper vorhanden, die Taf. VIII Fig. 51 in starker Vergrößernng zeigt. Am einfachsten wäre es anzunehmen, daß diese eigentümlichen Gebilde irgendwelche parasitische Organismen sein könnten. Aber diese Vermutung läßt sich nicht aufrecht halten, wenn wir die Körperchen mit den Kernen von *Trachelocerca* in Stadium „C" vergleichen, an welche sie in sehr vielen Beziehungen erinnern. Auch die Tatsache, daß ich solche sonst nie auftretenden Tiere nur nach der Conjugation fand, stützt meine Ansicht, daß diese kleinen Kerne aus dem Befruchtungskern durch successive Teilnngen entstanden sind.

Znm Schluß der Darlegungen über den Conjugationsvorgang möchte ich einen, wie mir scheint, anormalen Fall beschreiben. Es handelt sich um die erste Conjugation, die ich überhaupt gefunden habe. Ich erhielt sie in einem anderen Glas und bereits im April. Die Tiere wurden von mir nur lebend beobachtet, weshalb ich nicht viel über die Kernverhältnisse zu sagen habe.



Textfig. E.

Textfig. E zeigt das betreffende Paar, das offenbar schon zu Anfang des Prozesses isoliert wurde. Der ganze Vorgang verlief außerordentlich langsam. Im Moment der Isolierung waren die Kerne in den beiden Tieren noch sehr scharf konturiert, nnd es war

sehr leicht festzustellen, daß das größere Tier 11 Kerne besaß, das andere nur 7. Am folgenden Tage fand ich, daß das rechte Tier in seiner Größe sehr stark abgenommen hatte; alle Kerne waren in das zweite größer gewordene Tier übergewandert und waren bei weitem nicht mehr so deutlich zn sehen. Doch konnte man sie noch zählen und zwar waren es nur 14. Am nächsten Tage traten keine Veränderungen ein außer einer weiteren Verkleinerung des einen Tieres und einer Verminderung der Zahl der Kerne des anderen, die sich zu Gruppen gesammelt hatten.

Am vierten Tage nach der Isolierung fand ich nur ein freischwimmendes Tier. Nur mit großer Mühe habe ich später auch den abgefallenen Rest des anderen Conjuganten gefunden (Textfig. E 5).

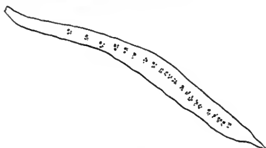
Er zeigte noch Beweglichkeit und sogar Kontraktionsfähigkeit. Das Tierchen wurde fixiert und gefärbt, aber, wie Taf. VII Fig. 40 zeigt, konnte man keine Spur von Kernen mehr finden, nur am vorderen Ende waren einige eigentümliche, stark lichtbrechende Körnchen vorhanden, die aber gar nicht an Kerne erinnerten. Das große kernhaltige Tier ging zwei Tage später zugrunde.

Da das der erste Conjugationsfall war, den ich gesehen habe, hielt ich ihn anfangs für eine normale Erscheinung. Ein so verlaufender Vorgang läßt sich vollständig mit der Verschmelzung der Micro- und Macrogameten bei Peritrichen vergleichen. Doch später fand ich immer nur die oben beschriebene „normale Conjngation“ mit der nachfolgenden Trennung und Erhaltung der beiden Individuen.

Von dem oben erwähnten Gesichtspunkt R. Hertwig's ausgehend, ist es nicht schwer, auch eine andere Erscheinung in den *Trachelocerca*-Kernen zu erklären. Ich meine nämlich die Bildung der erwähnten Kristalle innerhalb der Kerne. Als ich meine Knlturen anfangs April begann, bestanden sie ausschließlich nur aus den „B“-Formen mit normalen Kernen. Schon Ende April traten einige, zwar sehr seltene Exemplare mit wenigen Kristallen in den Kernen auf. Später nahm die Zahl von solchen allmählich zu und schließlich im August und September besaßen alle Tiere Kristalle. Oft kam es vor, daß sämtliche Kerne eines Tieres durch Kristallgruppen ersetzt waren. Textfig. „F“ stellt ein solches Tier im ganzen vor, von dem in Taf. VII Fig. 38 ein Ausschnitt stark vergrößert wiedergegeben ist. Den entsprechenden Teil eines lebenden Tieres sehen wir in Taf. VII Fig. 37. Ende September fand ich kein lebendes Tier mehr.

Das Studinm der Präparate zeigt, daß die Kristalle an der Stelle der chromatischen Körner sich entwickeln. Allmählich fangen diese

Körner an, sich nicht so stark mit Boraxkarmin zu färben, und dabei kommt es nicht selten vor, daß zwei oder drei Körner zusammenfließen. Weiter wandeln sich diese Elemente ganz allmählich in Kristalle des hexagonalen oder regulären Systems. Die Kristalle können sowohl nach der Ausbildung der Geschlechtskerne, wie auch vor der diese vorbereitenden Ausscheidung des Chromatins aus den oben erwähnten Körnern entstehen; in letztem Falle kommt die Ausscheidung der chromatischen Substanz resp. die Bildung der Geschlechtskerne überhaupt nicht zustande.



Textfig. F.

Das Vorkommen ähnlicher Kristalle im Tierreich, besonders bei Metazoen, ist keine seltene Erscheinung. List bringt dafür einige Tatsachen und stellt z. B. fest, daß Kristalle in Pigmentzellen der Echiniden vorhanden sind. Weiter sind sie für Arthropoden wohl bekannt (*Tenebrio molitor*), für den Menschen in den sogenannten Hodenzwischenzellen und sonst noch mehr.

Bei den Protozoen findet man am häufigsten solche Gebilde bei Amöben, wo sie von Auerbach für *Amoeba actinophora* schon im Jahre 1855 beschrieben wurden. In der neueren Zeit beschrieben sie Nereshelmer bei *Amoeba dofleini* und Prandtl bei *Amoeba proteus*. Schließlich ist, Zimmermann's Angaben nach, im Pflanzenreich die Verbreitung der Kristalle eine noch bedeutendere.

Für ihr Vorkommen in den Echinidenzellen hat List sicher ihren Ursprung nachgewiesen. Ganz richtig meint er, daß solche Kristalle als Produkte der Chromatinzersetzung zu betrachten sind. Ein solcher Ursprung aus den Kernen ist wohl in allen Fällen anzunehmen. Für *Amoeba proteus* z. B., bei der die Kristalle nicht in den Kernen sich entwickeln, hat Prandtl bewiesen, daß als Baumaterial in diesem Falle die Chromidien dienen.

Die große Verbreitung in den verschiedensten Tier- und Pflanzen-

gruppen zwingt nns, dieser Erscheinnng eine allgemeine Bedeutung znzuschreiben. Die Tatsache, daß die Kristalle in nicht normal funktionierenden Zellen sich finden, wie das bei *Amoeba proteus* oder in den absterbenden Pigmentzellen der Echiniden der Fall ist, spricht, im Zusammenhang mit ihrem Auftreten in den zugrundegehenden *Trachelocerca*-Kultnren, dafür, daß wir hier eine Degenerationserscheinung vor uns haben; R. Hertwig hat diesen Modns der Degeneration schon früher unter dem Namen „hypochromatische Kerndegeneration“ für die Geschwnlstzellen anfgestellt und Prandtl hat den Namen auch für *Amoeba proteus* angenommen.

Sehr auffallend ist die Tatsache, daß die Prozesse der physiologischen Degeneration, die einerseits zur Bildnng der Geschlechtskerne führen, andererseits ihren Ausdrnck in der Bildung von Kristallen finden, anch bei einkernigen Formen (A) vorkommen können.

Auch hier findet man zuweilen ganz ähnliche Bilder der Chromatinausscheidung, wie sie früher für die Form „B“ beschrieben wurden. Taf. VII Fig. 33 zeigt einen solchen Kern, an dem der Vorgang, vielleicht noch klarer als bei „B“-Formen, vor sich geht. Taf. VII Fig. 34 stellt folgendes Stadinm dar. Der Prozeß ist schon beinahe beendigt nnd bereits eine Menge chromatischer Klümpchen vorhanden, die wahrscheinlich zusammenfließen werden, um die in Taf. VII Fig. 35 u. 36 schon fertigen Geschlechtskerne zu bilden. An Fig. 34 sieht man, daß die Körner, aus welchen das Chromatin verschwnnden ist, beinahe überall zusammengeflossen sind nnd ein ganz blasses, großes Gebilde darstellen, das auffallend an die ersten Stadien der Kristallentwicklung erinnnert; an einer Stelle findet man sogar einen fertigen Kristall.

Die fertigen Geschlechtselemente liegen gewöhnlich in nicht großer Zahl im Innern des morulaartigen Kernes. Ihr Anssehen ist in keiner Beziehung von dem der Geschlechtskerne der „B“-Tiere abweichend.

Ich habe schon früher ausgesprochen, daß ich kein reiches Material an lebenden, einkernigen Tieren besaß, nnd deswegen konnte ich natürlich das weitere Schicksal der mit Micronucleen versehenen einkernigen Tiere nicht verfolgen. Doch, wegen der völligen Übereinstimmung in dem Aussehen und der Entwicklung der Befruchtungskerne bei „A“- nnd „B“-Tieren, scheint es mir ganz wahrscheinlich, daß solche Tiere anch conjugieren müssen. Es kann, wie oben schon erwähnt, absolut keine Grenze zwischen den Formen „A“ und „B“ gezogen werden; die letztere Tatsache spricht noch mehr dafür.

So sehr die beiden ersten *Trachelocerca*-Formen gleichartig erscheinen, so wenig Gemeinsames mit ihnen hat die dritte, die „C"-Form.

Das Ineinanderübergehen „A"- und „B"-Formen in „C" direkt festzustellen gelang mir nicht, aber das plötzliche Auftreten dieser einkernigen Tiere in den „C"-Kulturen und nicht minder die merkwürdigen Kerne in den „B"-Tieren nach der Conjugation (Taf. VIII Fig. 50) machen einen genetischen Zusammenhang sehr wahrscheinlich.

Ich habe genug Material von diesem Stadium gehabt, doch konnte ich wegen Zeitmangels mich nicht lange mit dieser Form beschäftigen, deswegen beschränke ich mich im folgenden auf die hauptsächlichsten Lebensvorgänge der „C"-Formen.

Die Tiere habe ich Mitte Dezember 1906 in einem Glas, das Seewasser mit Foraminiferen aus Rovigno enthielt, gefunden. Aber die Kultur befand sich in einem recht schlechten Zustand, das unbenützte Glas hatte lange Zeit ohne Pflege gestanden, der Salzgehalt war gestiegen und lebende Organismen waren nur spärlich vorhanden. In einer von zahlreichen Proben gelang es mir aber doch, ein Exemplar von *Trachelocerca* zu finden.

Eine vorsichtige Verdünnung und Durchlüftung des Wassers hatte zur Folge, daß Ende Dezember das Leben in meinem Aquarium aufblühte. Eine Menge von Foraminiferen, Algen, Infusorien usw. erschien. Auch Trachelocercen konnte ich jetzt ohne Mühe herausfischen. Später wurde diese Stammkultur in verschiedene Gläser zerteilt, und auf solche Weise habe ich bis April ununterbrochen eine Menge von Tieren gehabt. Besonders gut vermehrten sie sich in leicht faulendem Wasser.

Gerade bei diesen Tieren gelang es mir auch Uhrschalenkulturen zu führen. Ich konnte von einem Tier 150—200 Nachkommen züchten, doch alle diese Kulturen starben später aus. Ende April hatten alle Stammkulturen dieses Schicksal erlitten.

In freischwimmendem Zustand unterscheiden sich die „C"-Formen kaum von kleinen einkernigen Tieren. Aber die fixierten Tiere zeigen schon beim ersten Anblick ein ganz anderes Aussehen (Taf. VII Fig. 4).

Die Form des Leibes bleibt immer cylindrisch; sie nimmt nie eine ovale oder bandförmige Gestalt an. Am vorderen Ende findet sich ein in dem Bau den B-Formen ähnlicher Mundapparat, aber nicht selten kann man vom Mund nach rückwärts laufende, faden-

förmige Gebilde beobachten, die wahrscheinlich den Stäbchen des *Dileptus* analog sind.

Im Gegensatz zu den „A"- und „B"-Tieren ist das hintere Ende stets abgerundet und immer mit einer Vacuole versehen (Kontraktionsrhythmus 30—40 Min.). Von den Myofibrillen habe ich schon gesagt, daß sie nicht so stark entwickelt sind wie bei den anderen Formen, aber völlig gleichmäßig auf der ganzen Oberfläche sich verteilen.

Die Tiere sind nicht so empfindlich, und bei der Kontraktion kommt es zu keiner Biegung des Leibes.

Die Größe zeigt nicht solche Schwankungen, wie bei „A"- und „B"-Tieren; anfangs betrug sie in der Kultur im Durchschnitt 350 - 400 μ, später sank sie auf 300—200 μ herab.

Es gibt also einige morphologische Merkmale, die ziemlich scharf die „C"-Stadien von den anderen trennen. Aber noch viel mehr trifft dies bei Kernen und ihrer Verteilung in dem Plasmaleib zu. Aus Taf. VII Fig. 4 sehen wir, daß beinahe die ganze Zelle, mit Ausnahme der Pole, dicht mit kleinen, runden, stark färbbaren Körperchen gefüllt ist.

Bei dieser Form gelang es mir nicht selten, auch den Teilungsvorgang zu verfolgen, der in gleicher Weise wie bei „B"-Tieren vor sich geht. Die Tiere teilen sich in freischwimmendem Zustand durch Querschnürung mit ganz passiver Verteilung der Kerne. Taf. VIII Fig. 52 zeigt ein Tier, bei dem die Kerne in der Mitte schon auseinandergerückt sind und die spätere Durchschnürungsstelle deutlich erkennbar ist. Die Tiere „C" zeigten unter allen von mir untersuchten *Trachelocerca*-Formen die größte Vermehrungsfähigkeit. Ich konnte nämlich feststellen, daß bei Zimmertemperatur ungefähr alle 18—22 Stunden das Tier sich einmal teilt. Die Teilungen bei „B"-Tieren kommen nur alle 3 Tage zustande, und bei „A" scheint dies noch länger zu dauern.

Die Kerne der „C"-Formen haben ein so eigentümliches Aussehen und erinnern so wenig an die Kerne der übrigen Infusorien, daß Gruber sie überhaupt nicht als Kerne im eigentlichen Sinne betrachtete. Sie sind so zahlreich und klein und liegen so dicht nebeneinander, daß die Untersuchung der Totalpräparate über ihr Verhalten sehr wenig Aufschluß gibt. An dünnen Schnitten dagegen kann man feststellen, daß der Bau der Kerne ungemein verschieden sein kann. Trotzdem kann man als Grundform eine kleine, runde oder ovale Blase bezeichnen, die polar differenziert ist, in der an dem einen Pol ein von einem helleren Hof umgebenes Chromatinkorn liegt. Der andere Pol ist gewöhnlich von einer größeren Chromatin-

masse eingenommen (Taf. VIII Fig. 53, 54). Die Fähigkeit der verschiedenen Bestandteile, die Farbe aufzunehmen, kann variieren. Bald ist der kleine gehöfte Chromatinteil stärker gefärbt als der gegenüberliegende Pol, bald umgekehrt.

Ähnliche eigentümliche Kerne haben Léger und Hesse (1905) bei einem myxomycetenartigen Organismus gefunden und haben diese Kerne als „noyaux fongiformes" bezeichnet. Später hat Léger solche Kerne bei einigen Gregarinen vom Genus *Ophryocystis* wieder besprochen. In dieser ausführlichen Arbeit beschreibt er die Teilungen der Kerne, die, seiner Meinung nach, eine besonders primitive Mitosenart darstellen. Er konstatiert auch die Unbeständigkeit der verschiedenen Kernteile während der Ruhe sowohl wie bei der Teilung. Es kommt z. B. vor, daß der runde, mit einem Hof umgebene Chromatinteil, den er Caryosom nennt, während der Teilung sich bald auch teilt, bald aber spurlos verschwindet, um später in den Tochterkernen wieder zu erscheinen. Überhaupt schwankt der Charakter der Teilung sehr; es kommen manchmal sogar Centrosomen mit ihren Strahlungen vor. Mit Ausnahme dieses letzteren Punktes ist alles, was Léger für *Ophryocystis*-Kerne beschreibt, auch für die Kerne von „C"-*Trachelocerca* gültig.

Das sehr verschieden gebaute, ovale oder runde Bläschen (Taf. VIII Fig. 53—54) nimmt zuweilen eine spindelförmige Gestalt an. In diesem spindelförmigen Zustand variiert das Aussehen der Kerne noch mehr. Bald haben sie eine überraschende Ähnlichkeit mit kleinen Spindeln (Taf. VIII Fig. 53, 54, 59), bald besitzen sie eine ziemlich unregelmäßige Gestalt (Taf. VIII Fig. 55, 56, 58). Daß die langgestreckten Kerne Teilungsstadien darstellen, unterliegt keinem Zweifel. Dafür spricht auch der Umstand, daß die runden Kerne sehr oft zu Paaren beieinander liegen (Taf. VIII Fig. 55, 56). Doch wegen der herrschenden Unregelmäßigkeiten des Vorganges scheint es mir, daß hier nicht von mitotischen Teilungen die Rede sein kann.

Anfangs zeigten in dieser Kultur die Tiere meistens gleichartige Kerne von mehr oder weniger runder Form (Taf. VIII Fig. 53). Doch allmählich fand ich Exemplare, in denen Kerne z. B. solche fibrilläre Struktur hatten, wie das Taf. VIII Fig. 55 darstellt. Oder ich bekam Tiere, bei denen die Kerne nur ganz wenig chromatische Substanz in einem oder zwei Punkten gesammelt enthielten (Taf. VIII Fig. 57). Gewöhnlich kann man bei diesen Tieren zwischen den Kernen noch andere färbbare Teile von verschiedener, meistens unregelmäßiger Form finden. Zuweilen macht es den Eindruck, als ob das Chromatin teilweise in das Plasma ausgestoßen worden sei. Allmählich

werden dann Tiere häufig, deren Kerne offenbar Degenerationserscheinungen erlitten haben. So zeigt Taf. VIII Fig. 59 ein Tier, bei dem einige Kerne sich noch ganz normal färben, andere aber ganz blaß bleiben; oder noch besser Taf. VIII Fig. 58, wo beinahe alle Kerne ganz unregelmäßige Form angenommen haben.

Im Zusammenhang mit diesen Degenerationserscheinungen muß ich auf die Tatsache hinweisen, daß in den Kultnren „C" von mir auch die Tiere „A" gefnnden wurden. Anfangs konnte ich noch keine „A"-Formen nachweisen, aber im Febrnar nnd besonders im März traten die ersten einkernigen Tiere, wenn auch spärlich, auf.

2—3 Wochen später aber, als alle meine „C"-Tiere schon verschwunden waren, fand ich in einem Glas eine große Menge von ganz kleinen Trachelocercen. Es waren das überhaupt die kleinsten von allen, die ich gesehen habe. Ihre Größe betrug 0,1—0,25 mm. Ihr Aussehen stimmte vollständig mit dem der einkernigen Tiere überein, doch in bezug auf ihre Kerne zeigten sie ganz verschiedene Bilder. In Taf. VIII Fig. 60 haben wir ein Tier, das im allgemeinen noch den Charakter der „C"-Formen trägt. Es zeigt den größten Teil von seinen Kernen schon in Degeneration und anßerdem noch eine Anzahl gut färbbarer chromatischer Klümpchen im Plasma zerstreut. Fig. 61 und 64 stellen Tiere dar, bei denen noch degenerierende Reste zu sehen sind, der künftige Kern aber schon sich zu organisieren beginnt. An Fig. 63—64 ist nnr ein ganz kleiner Teil der chromatischen Elemente erhalten. Sie liegen zn einer lockeren Gruppe vereinigt. An Fig. 65 nehmen sie schon die Gestalt eines einheitlichen Kernes an, und Fig. 66, 67 endlich zeigen uns in den typischen mit Membran versehenen Kernen Stadien, die zu den „A"-Tieren überleiten.

Die Unterschiede zwischen Formen „A" und „B" einerseits nnd „C" andererseits sind in dem morphologischen Bau nnd in den Kernverhältnissen so bedeutend, daß, wenn alle Tiere wirklich zu einer Entwicklungsreihe gehören, wir von einem scharf ausgeprägten Dimorphismus sprechen müssen.

Generationswechsel bei Infusorien ist, soviel ich weiß, abgesehen von parasitischen *Opalina*-Arten, wo Neresheimer ihn auch annimmt, eine ganz neue Erscheinung. Dieser Umstand mahnt mich zur Vorsicht in meinen Schlüssen. Und da meine Beobachtungen nicht lückenlos erscheinen, so möchte ich auf Grund derselben das Vorkommen eines Generationswechsels nicht mit voller Bestimmtheit behaupten. Wie dem auch sei, die oben beschriebenen Tatsachen bleiben bestehen nnd bedürfen auf alle Fälle einer Erklärung. Mir

scheint, daß nur von dem weiter unten erörterten Gesichtspunkt aus sich die Möglichkeit einer Deutung ergibt. Es ist wahr, daß die abweichenden Merkmale der „C"-Formen so bedeutende sind, daß auf den ersten Blick die natürliche Vermutung die ist, es läge eine besondere Art vor, wie GRUBER seinerzeit auch gedacht hat. Indessen, wenn das der Fall wäre, wie könnten wir die Anwesenheit der oben beschriebenen, lückenlos die „C"- und „A"-Formen verbindenden Übergänge in den Kernformen verstehen? Auch die Tatsache, daß ich in meinen „C"-Kulturen, wo man während drei Monaten keine einkernigen Tiere nachweisen konnte, zum Schluß typische „A"-Tiere gefunden habe, spricht zugunsten eines genetischen Zusammenhanges beider Formen. Große Schwierigkeiten die Sache so aufzufassen, bieten uns nur die ganz merkwürdigen Prozesse der Kernresorption im „C"-Stadium und die Umwandlung der „C" in das Stadium „A". Es macht nämlich den Eindruck, als ob die aus Conjugation hervorgegangenen Tiere einige Zeit noch unverändert existierten und dann in ihren Kernen Veränderungen durchmachten, die sie wiederum zu einer geschlechtlichen Fortpflanzung vorbereiten.

Diese Schwierigkeiten werden durch eine Hypothese beseitigt, welche die Kernresorptionserscheinungen ganz verständlich, alle Vorgänge mit der niedrigen Organisation unseres Infusors in Einklang stehend und unseren Kenntnissen über Infusorien im allgemeinen nicht widersprechend erscheinen läßt.

Die Micronucleen bei *Trachelocerca* bilden sich, wie wir gesehen haben, in sehr großer Menge, aber nur einer von diesen führt den Befruchtungsvorgang durch.

Das gibt uns den ersten Anhaltspunkt.

Die Tatsache, daß die Infusorien zur Zeit der Conjugation oft viele, zuweilen sehr viele Micronuclei besitzen, ist bekannt. Diese Erscheinung hat seinerzeit LÜHE, GOLDSCHMIDT und POPOFF Veranlassung gegeben, die ganz berechtigte Meinung zu äußern, daß die Micronucleenbildung der Infusorien mit der Gametenbildung der anderen Protozoen vergleichbar ist. Nach dieser Meinung sind die Micronucleen ganz mit den Gametenkernen, z. B. der Rhizopoden, identisch. Der Unterschied besteht nur darin, daß der nach der Ausbildung der Gametenkerne bei den anderen Protozoen erfolgende Zerfall des Zelleibes in viele Fortpflanzungskörper bei den Infusorien nicht zustande kommt. Es ist sogar nicht schwer sich vorzustellen, was für ein Faktor hier möglicherweise den Ausschlag gegeben hat.

Die Schwärmer der Rhizopoden zeigen eine im Vergleich zu den Amöben sehr bedeutende Fähigkeit der Verbreitung im Raum.

Bei Infusorien ist das nicht nötig, denn die Zelle selbst besitzt die Fähigkeit der Fortbewegung in noch höherem Maße als die Flagellaten. Außerdem ist das Tier so hoch differenziert, daß der Ersatz einer sehr kompliziert gebauten Zelle durch viele kleine Flagellaten keinen Vorteil für die Art mit sich bringen würde. Darum ist es ganz verständlich, daß der bei anderen Protozoen vorhandene Zerfall des Zelleibes vor dem Befruchtungsvorgang bei den Infusorien umgangen wird. Anstatt dessen geht die Mehrzahl der Micronucleen zugrunde, ein Conjugationsvorgang kommt zustande und die alte Zelle existiert mit neuem Kernapparat weiter.

Es ist auch wohl bekannt, daß viele, besonders marine Foraminiferen und andere, einen Generationswechsel und mit ihm verbundenen Dimorphismus zeigen. Wenn wir als Beispiel *Trichosphaerium sieboldi* nehmen, den von Schaudinn so ausführlich bearbeiteten rhizopodenartigen Organismus, so sehen wir folgenden Lebenscyclus: Ein sogenannter Schizont kann sehr lange Zeit selbständig existieren. Er vermehrt sich durch Teilung oder Knospung, früher oder später aber kommt eine Zerfallteilung zustande: Es teilt sich das Tier in der Cyste in so viele Stücke, als Kerne vorhanden sind. Aus jedem dieser kleinen einkernigen Protoplasmastückchen wächst ein Tier heran, das einige von den Schizonten abweichende Merkmale zeigt. Schaudinn nennt es „Sporont". Durch Kernteilungen werden die Tiere vielkernig und können sich sehr lange Zeit durch Teilung oder Knospenbildung fortpflanzen. Früher oder später aber setzt wieder eine Zerfallteilung ein und es entsteht eine Menge ganz kleiner, einkerniger Tiere. Diese nun aus der Cyste ausschlüpfenden Tierchen sind mit einem Flagellum versehene Gameten; nach kurzer Zeit verschmelzen je zwei, wachsen heran und verwandeln sich in einen vielkernigen Organismus, der in seinem Bau dem Schizonten entspricht. Auf solche Weise wird der Cyclus geschlossen. Bei diesen Vorgängen ist, wie wir sehen, das ausschlaggebende Moment die Zerfallteilung, aus welcher eine andere Generation hervorgeht.

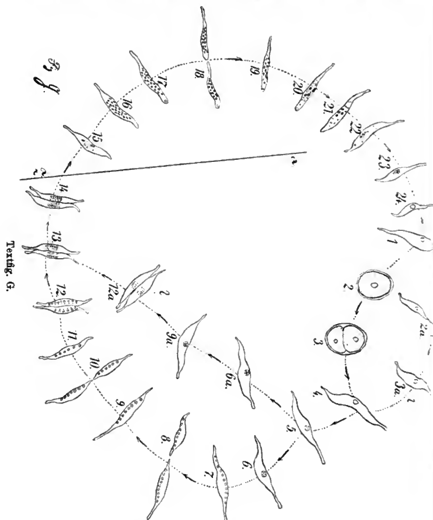
Wenn wir den Lebenscyclus des *Trichosphaerium* für uns als Schema ansehen, indem wir die Lebensvorgänge von *Trachelocerca* mit denjenigen von *Trichosphaerium* vergleichen, so kommen wir zu folgender Darstellung derselben. Ein einkerniges Infusor kann entweder als solches existieren, oder allmählich sich durch Zerfall des Kernes in ein vielkerniges Tier umwandeln. Es ist kein prinzipieller Unterschied zwischen beiden Formen vorhanden; in beiden spielen sich Vorgänge ab, die schließlich die Tiere zum Befruchtungsvorgang

führen. Eine solche Generation, die mit der geschlechtlichen Fortpflanzung endigt, können wir mit der Sporontengeneration von *Trychosphaerium* vergleichen. Wie diese Sporonten, so können die Trachelocercen in diesem Znstand sehr lange Zeit existieren und sich vermehren. Es ist ganz begreiflich, daß die mannigfaltigen Vermehrungsmodi bei *Trichosphaerium* dnrch die weit fortgeschrittene Differenzierung bei *Trachelocerca* auf eine einfache Querteilung beschränkt werden.

Früher oder später aber gehen diese Formen einem Befruchtungsvorgang entgegen, und es kommt znr Bildung der Geschlechtskerne. Bei *Trichosphaerium* ist, wie wir gesehen haben, dieses Moment dnrch den Zerfall des Tierleibes charakterisiert (Sporogonie). Bei *Trachelocerca* tritt dies aus den oden beschriebenen Gründen nicht ein. Die Zelle bleibt erhalten, nnd anstatt ihrer gehen die zahlreich entstandenen Micronuclei mit einer einzigen Ausnahme zngrunde. Die Copulation der *Trichosphaerium*-Gameten wird dnrch die vorübergehende Verschmelzung der Infusorien ersetzt. Es kommt zu einem Prozeß der Kernverschmelznng, und aus einem einzigen „Syncaryon“ entwickeln sich viele Kerne, die sich von denen der ersten Generation unterscheiden. Allmählich nimmt auch der Zelleib ein anderes Aussehen an, und es entsteht anf solche Weise eine andere Generation, die sich mit den Schizonten des *Trichosphaerium* vergleichen läßt. Jetzt können die Tiere sich wieder ernähren, teilen, kurz monatelang ganz selbständig existieren. Schließlich muß aber ein Zeitpunkt erreicht sein, welcher dem der Zerfallteilnng (Schizogonie) des *Trichosphaerium*, die bei *Trachelocerca* wieder nnterbleibt, entspricht. Die Zelle existiert weiter, die Kerne gehen znm größten Teil, wie die Micronnclei, zugrnnde, nur einige von ihnen fließen zusammen. So entstehen die einkernigen Tiere, die wieder die ursprünglichen anatomischen Merkmale besitzen, nnd nnn wieder dem Sporonten des *Trichosphaerium* vergleichbar sind. So ist der Cyclus geschlossen.

In der Textfig. G habe ich den Zeugungskreis von *Trachelocerca* schematisch dargestellt. Einige problematische Stadien, die zu beobachten mir nicht gelungen ist, die ich aber für sehr wahrscheinlich halte, habe ich mit einem Fragezeichen versehen. So z. B. 2a und 3a — die Teilungen der einkernigen Tiere im freien Zustande — oder 12a — die Conjugation der „A“-Tiere. Die Stadien von 1—14 entsprechen den Sporonten des *Trichosphaerium*; von 15 an können wir schon die andere Generation annehmen, deren zweite Grenze aber sich nicht scharf bestimmen läßt. Sie mnß irgendwo zwischen 21—23 liegen.

Wie mir scheint, können wir uns mittels dieser Hypothese die sonst ganz unverständlichen Lebensvorgänge von *Trachelocerca* mehr oder weniger erklären. Die Hypothese stimmt auch gut überein



Textfig. G.

mit der herrschenden Ansicht, daß die Infusorien von Rhizopoden abstammen. Ich will nicht ohne weiteres die durch das Studium eines so abweichenden und tiefstehenden Infusors gewonnene Hypo-

these für alle Infusorien verallgemeinern, doch ist es nicht ausgeschlossen, daß bei sorgfältigem und nach neuen Gesichtspunkten ausgeführtem Studium der anderen Infusorien in dieser Hinsicht interessante Ergebnisse zutage gefördert werden könnten.

Die primitive Natur von *Trachelocerca* geht, außer den oben erwähnten Dingen, aus der Kernstruktur und dem Kernteilungsmodus hervor. Am meisten spricht dafür aber die Abwesenheit typischer Micronucleen. Die einkernigen Tiere (A) sind besonders geeignet, diese Abwesenheit der Micronucleen zu konstatieren. Es scheint mir ausgeschlossen zu sein, daß die Micronuclei, besonders bei diesen Formen, übersehen worden sind. Wäre das der Fall, als was sollte man dann das oben beschriebene stark färbbare chromatische Gebilde und seine Entstehung auffassen? Es scheint mir deswegen sicher zu sein, daß in einigen Momenten seines Lebens unser Infusor keine Micronucleen besitzt. Desto interessanter ist es, daß schließlich micronucleiähnliche Gebilde entstehen. Wie im ersten Falle ohne Micronucleen können sich die Tiere auch mit Micronucleen ganz ungestört fortpflanzen. So haben wir ein Tier vor uns, das als Übergang zwischen echten Infusorien und einfacheren Formen, aus denen die Infusorien entstanden sind, betrachtet werden muß. Wie ich glaube, spricht die Art, wie die Geschlechtskerne bei unserem Tier entstehen, sehr für eine innige Verwandtschaft von *Trachelocerca* mit den Rhizopoden, weil die Entwicklung der genannten Kerne überaus viele Parallelen mit der Chromidienbildung bei Rhizopoden zeigt. Deswegen gewinnt *Trachelocerca* eine allgemeine Bedeutung; es zeigt uns, welche Bahn der phylogenetischen Entwicklung die Micronucleen der typischen Infusorien möglicherweise zurückgelegt haben.

Bis in die letzte Zeit war diese Frage beinahe gar nicht berührt. In den Fällen, wo die Micronuclei sich nicht konstatieren ließen, meinte man einfach, daß diese Unauffindbarkeit nur die Folge der ungenügenden Technik sei. Doch schon früher waren Fälle bekannt geworden, wo keine Micronuclei vorhanden waren, z. B. *Opalina*-Arten. Neresheimer hat in neuester Zeit in seiner Arbeit darüber ganz ausführliche Aufschlüsse gebracht. Die Bildung der Geschlechtskerne geht bei diesem Tiere vollständig nach dem Rhizopodenschema vor sich. Infolgedessen meint der Verfasser, daß *Opalina* kein echtes Ciliat, sondern ein plasmodromenartiger Organismus sein müsse.

In allerjüngster Zeit hat derselbe Autor gezeigt, daß auch bei einem Infusor — *Ichthyopthirius multifiliis* — aus der Familie der

Holophryinen die Micronuclei nicht immer vorhanden sind. Die erwachsenen, auf der Haut von verschiedenen Fischen schmarotzenden Tiere zeigen keinen Micronucleus, nur wenn das Infusor in der Cyste durch viele aufeinanderfolgende Teilungen sich fortpflanzt, tritt in einem bestimmten Moment aus den Macronucleen der schon ziemlich kleinen Tiere ganz plötzlich ein chromatisches Stück heraus, das einen Micronucleus darstellt. Jetzt teilen sich die kleinen *Ichthyopthirius* weiter und machen schließlich eine Autogamie durch.

In sehr vielen Einzelheiten stellt sich *Ichthyopthirius* als ein typischer Infusor dar, und es ist schwer, die plötzliche Entstehung der Micronucleen bei ihm von Chromidienbildung, wie bei *Opalina*, abzuleiten. Stellen wir aber *Trachelocerca* mit ihrer eigentümlichen Micronucleenbildung dazwischen, so ist die Kluft überbrückt; denn was bei *Ichthyopthirius* so plötzlich und unklar vor sich geht, können wir bei *Trachelocerca* schrittweise verfolgen.

Trachelocerca ist auch darum in dieser Frage wichtig, weil man einwenden könnte, die Erscheinungen bei *Opalina* möchten in irgendeiner Abhängigkeit vom Parasitismus stehen. Für *Trachelocerca* ist diese Möglichkeit ausgeschlossen. Deshalb habe ich auch absichtlich von *Opalina* als Vergleichsobjekt abgesehen, obwohl Nereshеimer hier auch eine Art Dimorphismus beschreibt, der seiner Meinung nach das Tier zu den Plasmodromen stellt. Nachdem wir nun im Lebenscyclus von *Trachelocerca* analoge Vorgänge kennen gelernt haben, glaube ich nicht, daß wir auf Grund des Dimorphismus einen mit Cilien versehenen Organismus von den Ciliaten trennen dürfen.

Was die systematische Stellung des Tieres anbetrifft, so ist es beim Mangel unserer Kenntnisse über die Lebensgeschichte der meisten Infusorien schwer, etwas Definitives zu sagen. Unsere gegenwärtige Klassifikation beruht beinahe ausschließlich auf den anatomischen Merkmalen. Auf Grund des nicht richtig dargestellten Mundapparates wurde *Trachelocerca* von Entz in die Enchelidenfamilie gestellt. Ich glaube jedoch, daß *Trachelocerca* mit dieser Familie nicht viel Verwandtschaft zeigt. Doch gibt es tatsächlich Tiere, die mit unseren viel Übereinstimmendes haben. Dazu gehören die sogenannten „vielkernigen“ Infusorien.

Jedoch muß man unter diesen Gruppen unterscheiden, die nicht verwandt sind. Merkwürdigerweise treten Repräsentanten gleicher Familien im Süßwasser mit einem oder wenigen Kernen auf, im Meereswasser dagegen als vielkernige Tiere. Z. B. vielkernig sind die marinen Infusorien *Holophrya oblonga*, *Oxytricha flava* u. a., denen ein- oder zweikernige Arten im Süßwasser entsprechen. Die Viel-

kernigkeit solcher Formen steht sicher in direktem Zusammenhang mit dem Leben im Meer. Als Charakteristikum für solche Tiere sehe ich das Znsammenfließen aller Kernpartikelchen bei der Teilung in eine Masse an.

Es gibt aber noch vielkernige Infusorien, bei denen während der Teilnng die Kerne nicht znsammenfließen, sondern passiv auf die Tochtertiere verteilt werden. Zn diesen gehören, wie im Meerwasser *Choenia*, *Uroleptus*, *Epiclinites*, so im Süßwasser eine andere Art von *Choenia*, *Loxodes*, *Dileptus*.

Spärlichen Detailzeichnungen ans Gruber's Arbeiten zufolge kann man annehmen, daß bei *Uroleptus* die Kerne sehr ähnlich denen von *Trachelocerca* in Stadium „C“ sind (Gruber 1888, Taf. VI Fig. 7). Eine überraschende Ähnlichkeit der Kerne konnte ich aber konstatieren auf von mir selbst gefertigten Präparaten von *Dileptus gigas*. Diese Ähnlichkeit berührt aber nicht nur die Kerne. Anch die änßere Erscheinung der Tiere kann tänschend ähnlich sein (*Dileptus*, *Trachelocerca* Stadium „B“). Dazu kommt noch, wie ich schon gezeigt habe, eine große Übereinstimmung im Bau des Mundapparates. Für *Trachelocerca* wie *Loxodes* (weniger für *Dileptus*) sind auch die auffallenden Schwanknngen in der Größe der Individuen charakteristisch. Die Kerne von *Loxodes* können ferner mit einigen von *Trachelocerca* in Stadium „C“ verglichen werden.

Die Frage nach den Micronuclei bei diesen Formen ist noch gar nicht entschieden. Ob die bei *Loxodes* so oft neben den Kernen vorhandenen kleinen Chromatinstückchen die Micronuclei sind, und ob sie durch ein Austreten ans den großen Kernen entstehen, wie das Joseph abbildet, bedarf noch der Nachprüfnng. Ebenso unklar ist die Micronucleenfrage bei *Dileptus*: bleiben sie stets erhalten, oder sind sie nur vorübergehend vorhanden? — Das alles sind Fragen, die eines sorgfältigen Stndiums bedürfen. Doch scheint mir sicher, daß alle diese Infusorien eine natürliche Gruppe bilden, die in einigen Vertretern (*Trachelocerca*, *Dileptus*) eine auffallend hohe morphologische Differenzierung erreicht hat, so daß wir in ihr einen schon früh abgezweigten und teilweise sehr hoch entwickelten Ast des Infusorienstammes sehen müssen.

München.

Literaturverzeichnis.

1856 Auerbach: Über Einzelligkeit der Amöben. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. VII p. 363—427.

1889 Bütschli: Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. Protozoen. Bd. III.

1866 Cohn, F.: Neue Infusorien im Seeaquarium. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. XVI p. 253—302.

1841 Dujardin, F.: Histoire natur. des Zoophytes infusoires, Paris. I.

1840 Ehrenberg: Diagnose von 274 neuen Infusorien. Monatsb. d. kgl. preuß. Akad. d. Wiss. zu Berlin.

1884 Entz, G.: Über die Infusorien des Golfes von Neapel. Mitteil. d. Zool. Station Neapel Bd. V p. 289—444.

1904 Goldschmidt, R.: Die Chromidien der Protozoen. Arch. f. Protistenk. Bd. V.

1904a —: Der Chromidialapparat lebhaft funktionierender Gewebszellen.

1907 —: Lebensgeschichte der Mastigamöben Mastigella vitrea und Mastigina setosa. Arch. f. Protistenk. 1907 Suppl. I.

1884 Gruber, A.: Über Kern und Kernteilung bei den Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. XL p. 121—153.

1884a —: Die Protozoen des Hafens von Genua. Nova Act. Acad Caes. Leop. Car. Natur. Cur. Vol. XLVI p. 67.

1887 —: Weitere Beobachtungen an vielkernigen Infusorien. Ber. d. naturf. Gesellschaft zu Freiburg Bd. III p. 57—70.

1903 Hamburger, C.: Beiträge zur Kenntnis von Trachelius ovum. Arch. f. Protistenk. Bd. II.

1898 Hertwig, R.: Über Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium eichhorni. Abh. bayr. Akad. Wiss. V. 19.

1902—03 —: Über Wechselverhältnis von Kern und Protoplasma. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morph. u. Phys. München 1. Nov. 1902 und 19. Mai 1903.

1904 —: Über physiologische Degeneration bei Actinosphaerium eichhorni. Festschr. f. Haeckel (G. Fischer).

1907 Joseph, H.: Beobachtungen über die Kernverhältnisse von Loxodes rostrum M. Arch. f. Protistenk. Bd. VIII p. 344—369.

1880—82 Kent, S.: A manual of the Infusoria, London.

1907 Léger, L.: Les Schizogrégarines des Trachéates. Arch. f. Protistenk. Bd. VIII p. 159—202.

1897 List, Th.: Über die Entwicklung von Proteinkrystalloiden in den Kernen der Wanderzellen bei Echiniden. Anat. Anz. Bd. XIV.

1786 Müller, O. F.: Animalc. Infusoria fluviat. et marina etc. Hafniae et Lepsiae.

1889 Maupas, E.: Le rajeunissement karyogamique chez les Ciliés. Arch. Zool. Expér. P. 7.

1902 Nereshеimer, E.: Über die Höhe histologischer Differenzierung bei heterotrichen Ciliaten. Arch. f. Protistenk. Bd. II.

1905 —: Über vegetative Kernveränderungen bei Amoeba dofleini. Arch. f. Protistenk. Bd. VI.

1907 —: Die Fortpflanzung der Opalinen. Arch. f. Protistenk. 1907 Suppl. I.

1908 —: Der Zeugungskreis des Ichthyophthirius. Bericht kgl. bayr. biol. Versuchsstat. München Bd. I.

1907 Popoff, M.: Depression der Protozoenzelle und der Geschlechtszellen der Metazoen. Arch. f. Protistenk. 1907 Snppl. I.
1908 —: Die Gametenbildung und die Conjngation von Carchesium polypinnm. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. LXXXIX Heft 3.
1906 Prandtl, H.: Die Conjngation von Didininm nasutnm. Arch. f. Protistenk. Bd. VII.
1907 —: Die physiologische Degeneration der Amoeba protens. Ebenda Bd. VIII.
1898 Prowazek, S.: Protozoenstudien. Bursaria truncatella nnd ihre Conjngation. Arh. zool. Inst. Wien Bd. XI.
1867 Quennerstedt, A.: Bidrag til sweriges Infusorienfanna. Acta universitat. Indensis. Bd. IV.
1896 Reinke, F.: Beiträge znr Hystologie der Menschen. Arch. f. mikr. Anat. 1896.
1899 Schaudinn, F.: Untersnchnngen über den Generationswechsel von Trichosphaerinm sieboldi. Anhang z. d. Abh. d. kgl. preuß. Akad. Wiss. Berlin.
1896 Schewiakoff, B.: Infnsoria Aspirotricha (russisch). Mémoir. de l'Acad. des Sciences de Pétersbonrg Bd. IV, VIII.
1906 Schröder, O.: Beitrag zur Kenntnis von Stentor coernleus und St. roeselii. Arch. f. Protistenk. Bd. VIII.
1859 Stein, Fr.: Der Organismus der Infnsionstiere. Leipzig 1859.
1906 Versluys: Über die Conjngation der Infusorien. Biol. Centralbl. Bd. XXVI.
1896 Zimmermann, A.: Morphologie nnd Physiologie des pflanzlichen Kernes. Jena.

Tafelerklärung.

Beinahe alle Figuren sind mittels des Abbé'schen Zeichenapparates auf der Objekttischhöhe gezeichnet. Apochromaten von Zeiss, Compensationsokulare.

Angewandte Bezeichnungen: „B“ die Reihe der Basalkörperchen; „Kr“ die großen Kerne; „k“ kleine Kerne; „Mk“ Micronuclei; „M“ Muskelfibrille; „m“ eine andere Art von Fibrillen.

Tafel VII.

Fig. 1. Einkerniges Tier (Stadium A). Größe $1^1/_2$ mm. Apochr. 16 mm, Comp. Oc. 4. Der Kern von demselben Tier ist in Fig. 33 stark vergrößert abgebildet.

Fig. 2. Stadium B. Besonders grosses Tier mehr als $1^1/_2$ mm. Apochr. 16 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 3. Stadium B. Das Tier enthält sehr viele Kerne. Größe gegen 600 μ. Apochr. 8 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 4. Stadium C. Größe gegen 300 μ. Apochr. 3 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 5—7. Das vordere Ende des Tieres nach dem Leben gezeichnet. Ohne Zeichenapparat. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 5 vom Rücken.
Fig. 6 im Profil.
Fig. 7 von vorne.

Fig. 8. Einkerniges Tier mit der sogenannten Längsfurche. Apochr. 8 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 9. Querschnitt durch ein Tier Stadium B, um die Unterbrechung der Pellicula in der Längsfurche zu zeigen. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 10. Ein Teil der Oberfläche des Tieres mit sehr ausgeprägten Myofibrillen. Im Centrum scheint eine Fibrille zu fehlen. Mit Boraxkarmin gefärbtes Totalpräparat. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 11. Ein Längsschnitt durch ein „A“-Tier, an welchem die zweite Art der Fibrillen besonders deutlich zu sehen ist. Eisenhämatoxylin. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 12. Querschnitt durch ein „A“-Tier. Man sieht die Basalkörperchen der Wimpern und zwei quergeschnittene Fibrillen (vgl. Fig. 11). Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 13. Querschnitt durch ein „A“-Tier, der nur eine Fibrille aufweist (vgl. Fig. 10). Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 14. Der Kern eines „A“-Tieres. Im Innern des Kernes sind keine Differenzierungen zu sehen. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 15—17. Verschiedene Stadien der Kernzerstückelung. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 18. Eine Cyste des einkernigen Tieres. Das Tier hat sich schon geteilt. Ohne Zeichenapparat nach dem Leben gezeichnet. Leitz 7, Oc. 3.

Fig. 19. Ein „A“-Tier mit zwei Kernen. Hom. Imm. 2 mm, Comp. O. 4.

Fig. 20. Ein Teil eines „B“-Tieres mit normalen Kernen. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 21. Teilungsstadien der chromatischen Körner im Innern der Kerne von „B“-Tieren. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 22a u. b. Dieselben stärker vergrößert. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 23—27. Verschiedene Bilder der Chromatinausscheidung in den Kernen von „B“-Tieren. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 28—31. Die folgenden Stadien der Bildung der Geschlechtskerne bei „B“-Tieren. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 32. Eine typische Gruppe, aus zwei größeren, zwei kleineren und zwei von ihnen eingeschlossenen Befruchtungskernen bestehend. Hom. Imm. 2 mm. Comp. Oc. 4.

Fig. 33—36. Verschiedene Stadien der Bildung der Geschlechtskerne bei „A“-Tieren. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 37. Ein Teil eines „B“-Tieres, bei dem das Protoplasma vollständig mit Einschlüssen erfüllt und das Chromatin der Kerne in Kristalle umgewandelt ist. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 8. Nach dem Leben gezeichnet.

Fig. 38. Aus der chromatischen Substanz entstandene Kristalle. Eisenhämatoxylin. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 8.

Fig. 39. Der Teilungsvorgang bei einem „B“-Tier, nach dem Leben gezeichnet.

Fig. 40. Kernloser Rest eines Tieres nach dem Conjugationsvorgang. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 41 u. 42. Das allgemeine Aussehen der Tiere während der Conjugation. Apochr. 8 mm, Comp. Oc. 4.

Tafel VIII.

Fig. 43. Das erste Stadium des Conjugationsvorganges. Eine vollkommene Trennung der Geschlechtskerne von den somatischen Kernen. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 44. Ein weiteres Stadium des Vorganges. Die Geschlechtskerne zeigen eine wabige Struktur. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 45. Die letzten Momente der Conjugation. Bildung der Austauschspindeln. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 46. Austauschspindeln der Fig. 45 stärker vergrößert. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 47. Die Teilung der Micronuclei. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 6.

Fig. 48. Ein Exconjugant mit den zugrunde gehenden alten Kernen und zwei Spindeln, die aus dem einzigen Befruchtungskern entstanden sind. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oe. 4.

Fig. 49. Eine solche Spindel stark vergrößert. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 18.

Fig. 50. Eine weitere Stufe iu der Entwicklnng eines Exconjnganten. Das Tier enthält die Reste der alten Kerne sowie auch eine Menge ganz kleiner neuer Kerne. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 4. Wegen der Konservierung nicht mit heißem Snblimat, wie im Falle aller anderen Präparate, ist das Plasma teilweise herausgetreten.

Fig. 51. Die kleinen Kerne der Fig. 50 stärker vergrößert. Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 12.

Fig. 52. Der Teilungsvorgang eines „C"-Tieres. Apochr. 8, Comp. Oc. 4.

Fig. 53—58. Verschieden aussehende Kerne der „C"-Tiere. Fig. 54 Hom. Imm. 2 mm, Comp. Oc. 18, alles übrige 2 mm, Comp. Oc. 4.

Fig. 59—60. Verschiedene Bilder der Kerndegeneration der „C"-Tiere.

Fig. 61—65. Verschiedene Stufen der Entstehung einkerniger Tiere aus „C"-Stadien.

Fig. 67—68. Typische einkernige Tiere; Kern mit Membran versehenen.

Notizen über *Opalina ranarum*

nebst Bemerkungen

über die Unterscheidung von Erythro- und Cyanochromatin.

Von

Dr. **Waldemar Loewenthal** (Hagenau i. Els.).

(Hierzu 1 Textfigur.)

Obgleich schon seit mehreren Jahren mit Untersuchungen an *Opalina ranarum* beschäftigt, bin ich trotzdem durch die notwendige Erfüllung dienstlicher Obliegenheiten außerstande, zu einem Abschluß zu gelangen und mein angesammeltes Material zu verarbeiten; ich will deshalb außer Zusammenhang einige Beobachtungen hier mitteilen, soweit sie mir von Interesse und zur Vervollständigung unserer Kenntnisse der *O. ranarum* dienlich scheinen.

Ich habe mich insbesondere mit den Erscheinungen beschäftigt, die mit der Encystierung der *Opalina* in Zusammenhang stehen. Es ist seit den Untersuchungen von Engelmann und von Zeller bekannt, daß die Infektion der Frösche mit diesem Darmparasiten im Kaulquappenstadium erfolgt durch Cysten, die von den zur Copulation ins Wasser gehenden Fröschen entleert werden. Würden nun nur durch die erwachsenen Frösche die Cysten ausgeschieden, so müßten, da *Rana temporaria* erst mit vier Jahren geschlechtsreif wird (nach Leunis Synopsis), die von der Kaulquappe aufgenommenen Opalinen vier Jahre im selben Tiere frei leben, bis dann erst wieder Encystierung einträte. Dies ist jedoch nicht der Fall, auch im Darm kleiner, noch nicht geschlechtsreifer Frösche encystieren sich die Opalinen im Frühjahr. — Soweit ich habe beobachten können, werden

die freien Opalinen nicht mit den Fäces ausgeschieden, wohl aber die Cysten. Es liegt dies daran, daß die Cysten und die sich encystierenden Tiere im Enddarm dem Kotballen innig beigemengt sind, während außerhalb der Encystierungszeit die Opalinen sich zwischen Kotballen und Darmwand aufhalten und im Innern des Kotballen nicht oder nur spärlich zu finden sind.

Ich hatte in meiner ersten Mitteilung angegeben, daß die Opalinen sich innerhalb der Cyste teilen könnten; ich hatte den angenommenen Teilungsprozeß nicht direkt verfolgt, sondern daraus erschlossen, daß ich Cysten fand, die zwei Tiere enthielten. Diesen Befund habe ich seither noch öfter machen können, er läßt aber nicht notwendig auf Teilung innerhalb der Cyste schließen, sondern es liegt auch die Möglichkeit vor, daß einige der von mir (und anscheinend auch von Przesmicky) gesehenen zweikernigen Cysten durch Vereinigung zweier Cysten entstanden waren. Mir fielen nämlich einmal in einem Präparat aus dem Darminhalt einer infizierten Kaulquappe, das ich im hängenden Tropfen untersuchte, zwei annähernd kugelige Cysten auf, die umeinander rotierten. Bei genauerer Betrachtung erkannte ich, daß die beiden Cysten an der Berührungsstelle durch ein Loch kommunizierten, und daß das eine der beiden Tiere höckerförmig in dies kleine Loch hineinragte. Unter fortwährender Rotation erweiterte sich die Verbindung, wobei das eine Tier dauernd durch die Öffnung hindurchzuschlüpfen suchte, und schließlich entstand unter meinen Augen allmählich aus beiden eine einzige, leicht sanduhrförmig eingeschnürte Cyste, innerhalb deren die beiden Tiere nun um die gemeinsame Längsachse rotierten.



Ich habe das Objekt in diesem Zustand mit Sublimat-Alkohol fixiert und mit Eisenhämatoxylin gefärbt (vgl. Textfig.); die Beobachtung dauerte schätzungsweise 15 Minuten. Welche biologische Bedeutung diesem merkwürdigen und bei *Opalina* anscheinend seltenen Vorgang zukommt, vermag ich nicht anzugeben; vielleicht handelt es sich um ein pathologisches Vorkommnis infolge der künstlichen starken Infektion.

Ich habe eine eigentümliche Kerndifferenzierung bei den Opalinen zur Encystierungszeit beschrieben, daß nämlich aus der im Kerncentrum angesammelten chromatischen Masse ein kugeliger Körper ausgestoßen wird, der sich der Kernperipherie anlegt, wodurch der Kern ein höchst charakteristisches Aussehen gewinnt. Neresheimer,

der diese charakteristischen Kerne ausführlich bespricht, läßt die Chromatincalotten an der Kernperipherie sich allmählich ansammeln; man findet aber bei Durchsicht eines größeren Materials immer wieder gelegentlich ein Exemplar, das den Austritt eines größeren Körpers aus der centralen Chromatinmasse zeigt (vgl. Fig. 6 meiner vorläufigen Mitteilnng), so daß ich die von mir beschriebene Entstehungsweise aufrecht erhalten mnß. NERESHEIMER's Angabe, daß der Körper später aus dem Kern ansgestoßen wird und neben ihm zn finden ist, kann ich bestätigen. Ich hatte versncht, diesen Körper einem Micronucleus gleichzustellen,[1]) doch ist diese Deutung nach NERESHEIMER's Untersuchungen nicht mehr haltbar, sondern es ist wahrscheinlicher, mit NERESHEIMER in dem Vorgang ein Analogon zur Richtungskörperbildung zu erblicken. Immerhin erscheint es nicht uninteressant, die Natnr dieser Körperchen etwas näher zu nntersuchen. NERESHEIMER bezeichnet ihre Substanz direkt als Chromatin, und hierzu ist man wohl auch ohne weiteres berechtigt, wenn man, wie ich es getan habe, Chromatin definiert als diejenige Substanz im Kern, die eine ausgeprägte Affinität zu den sog. Kernfarben, also Hämatoxylin nnd Karmin, hat; freilich ist gerade mit Hämalaun die Färbung des in Rede stehenden Körperchens eine weniger intensive. Nun wird in den letzten Jahren die Rotfärbung bei Anwendung von Methylenazurfärbungen (ROMANOWSKI, GIEMSA usw.) gewissermaßen als Chromatinreaktion angesehen. Bei Färbung von Schnitten mit GIEMSA-Lösung[2]) tritt nun ausschließlich an den im Kerninnern befindlichen Chromatinpartikeln die Rotreaktion ein, das besprochene Körperchen dagegen färbt sich rein blan. Gerade umgekehrt ist das Verhalten bei Anwendung von Methylgrün in schwach essigsaurer Lösung, eine Färbung, die zeitweise als besonders sicher für den

[1]) Die Ähnlichkeit mit der von NERESHEIMER entdeckten Entstehung des Micronuclens hei *Ichthyophthirius* ist sehr augenfällig.

[2]) Ich wiederhole hier die au etwas versteckter Stelle (Zeitschr. f. Krebsforschnng Vol. 5 1907) angegebene Technik der GIEMSA-Färhung von Schnittpräparaten: Färhung mit stark verdünnter Giemsalösung (6 Tropfen anf 30 ccm Aq. dest.), bis bei Gasglühlicht die Zellkerne rot erscheinen (6—9 Stunden, bei manchen Objekten auch 24—30 Stunden), differenzieren in 70 und 80proz. Alkohol, bis keine blauen Farhwolken mehr ahgehen, danach möglichst rasches Entwässern, gründliches Abspülen des Alkohols mit Xylol, Kanadabalsam, Deckglas. Manche Präparate verderben nach einigen Jahren, was aber auch bei Trockenpräparaten mitunter vorkommt. Die Färhung mißlingt häufig und ist mir hisher überhaupt nur nach Fixierung mit Suhlimat oder Suhlimatalkohol gelungen. Die Rotfärhung ist hei hellem Auerlicht hesser zu erkennen, als bei Tageslicht.

Chromatinnachweis galt: nur die Körperchen färben sich, das Chromatin im Kerninnern bleibt ungefärbt. Bei Behandlung des unfixierten Materials mit verdünnter Essigsäure tritt das beschriebene Körperchen dentlicher hervor und bildet eine homogene, stärker lichtbrechende Masse, das übrige Chromatin bildet einen krümeligen Haufen in der Mitte des Kerns; nach Zusatz von Ammoniak werden beide Kernanteile in gleicher Weise unsichtbar, zeigen also beide gegen Essigsänre und Ammoniak das Verhalten von Chromatin. Ich habe das mit Ammoniak behandelte Material mit heißem Sublimatalkohol fixiert nnd mit Eisenhämatoxylin gefärbt und dabei gefunden, daß die beiden unsichtbar gewordenen Kernanteile nicht gelöst waren, sondern nur stark gequollen; besonders deutlich war die Veränderung an den Körperchen, die nach der Ammoniakbehandlung bedeutend größer waren und nicht homogen, wie gewöhnlich, sondern stark vakuolisiert. Die Essigsäurepräparate boten gefärbt denselben Befund wie ungefärbt. Die Chromatincalotten an den Kernen der freien Tiere vor der Encystierung stimmen in bezug auf alle Reaktionen mit den herausdifferenzierten Körperchen überein.

Die beiden Kernanteile verhalten sich also beide als Chromatin (abgesehen von der mangelnden Färbbarkeit des centralen Anteils mit Methylgrün), nur daß bei GIEMSA-Färbung der eine Chromatinanteil sich rot färbt, der andere blau; VON LEYDEN und ich haben gelegentlich der Untersuchungen an *Entamoeba buccalis* es für nicht angängig erklärt, dem sich blau färbenden Anteil etwa die Anerkennung als Chromatin zu versagen, und haben die rein descriptive Unterscheidung als Erythrochromatin und Cyanochromatin vorgeschlagen, indem wir die Möglichkeit offen ließen, daß sich die beiden so bezeichneten Modifikationen mit funktionell unterschiedenen Chromatinmodifikationen decken könnten.[1] Daß es tatsächlich verschiedene Chromatine gibt, wird in letzter Zeit durch immer zahlreichere Beobachtungen dargetan, bald durch Färbungsnuaucen, bald durch eigenartiges Verhalten bei der Kernteilung und den Geschlechtsvorgängen, und die tiefstgreifende Unterscheidung ist in der immer mehr Boden gewinnenden, auf SCHAUDINN zurück-

[1] Diese Unterscheidung ist, soviel ich weiß, bisher nur von PROWAZEK und von L. MICHAELIS angenommen worden. PROWAZEK (Arb. a. d. kais. Gesundheitsamt Vol. 23 1906) hat unsere Angabe mißverstanden: Die Kerne der *Entamoeba buccalis* färben sich nicht bald rot, bald blau, sondern ein bestimmter Anteil des Kerns, nämlich der Binnenkörper, färbt sich rot, und ein anderer Kernanteil, die Peripherie, blau.

gehenden Anschauung von dem durchgängigen Vorhandensein eines somatischen und eines Geschlechtschromatins gegeben.

Nun ist mir freilich die Abhängigkeit gerade der Giemsa-Färbung von der physikalischen Beschaffenheit (Dichte u. dgl.) des zu färbenden Objektes bekannt, dennoch aber erscheint mir das Verhalten bei *Entamoeba buccalis* und bei *Opalina ranarum* zu auffällig und konstaut, als daß ich die differente Färbung der verschiedenen Kernanteile als bloßen Ausdruck verschiedener physikalischer Beschaffenheit auffassen zu sollen glauben möchte, und ich glaube vielmehr einen inneren Unterschied zwischen Erythro- und Cyanochromatin annehmen zu müssen. Es drängte sich mir, im Verfolg von Schaudinn's Lehre von der prinzipiellen Doppelkernigkeit der Zelle, der Gedanke auf, ob die färberische Differenz der beiden Chromatine nicht hiermit in Zusammenhang stehen könnte, nnd so machte ich einige Färbeversnche an Ciliaten, bei denen ja das somatische und das Geschlechtschromatin als Macro- und Micronucleus getrennt ist. Ich nahm dasjenige Material, das mir am leichtesten in einer für Schnittpräparate ausreichenden Menge zu Gebote stand, Balantidien aus dem Enddarm des Frosches und die verschiedenartigen (für diesen Zweck nicht näher bestimmten) zahlreichen Infusorien aus dem Netzmagen und Pansen von Rind und Schaf. Das Ergebnis der Giemsa-Färbung war, daß, soweit die Rotreaktion zustande kam, entweder überhaupt nur der Micronucleus rot wurde und der Macronucleus blau, oder wenigstens der Micronucleus ein deutlicheres Rotviolett zeigte als der Macronucleus. Auch hierbei spielen offenbar physikalische Verhältnisse mit, denn ein aufgelockerter oder zerfetzter Macronucleus kann manchmal recht deutliche Rotreaktion zeigen.

Es geht also hieraus hervor, daß das Geschlechtschromatin als Erythro- und das somatische als Cyanochromatin erscheinen kann; ob aber umgekehrt bei der färberischen Differenzierung zweier Chromatine jedesmal das Erythrochromatin als Geschlechtschromatin und das Cyanochromatin als somatisches anzusehen ist, diese Frage kann erst durch weitere Untersnchungen entschieden werden; zum mindesten hätte diese Annahme heuristischen Wert. Bei *Opalina* würde die Auffassung des Cyanochromatins als somatisches Chromatin recht plausibel sein: die beschriebene Heransdifferenzierung und Ausstoßung eines Körpers aus dem Kern würde die Befreiung des Geschlechtskernes von überflüssigem somatischen Chromatin bedeuten. Schwieriger sind die Verhältnisse bei *Entamoeba buccalis*, deren Chromidien aus Cyanochromatin bestehen, wenn man

annimmt, daß die weitere Entwicklung der Amöbe den von SCHAUDINN bei *Entamoeba histolytica* beschriebenen Vorgängen entspricht; es ist aber über das Schicksal der Chromidien bei *Entamoeba buccalis* nichts bekannt, und es ist also sehr wohl möglich, daß die von VON LEYDEN und mir beobachteten, aus Cyanochromatin bestehenden Chromidien tatsächlich somatische Chromidien waren. Die Chromidien von *Opalina*, die nach NERESHEIMER's Untersuchungen die Geschlechtskerne bilden, erweisen sich in meinen Präparaten als Erythrochromatin, ein Verhalten also, das vollkommen zu der gemachten Annahme über die mögliche Bedeutung der Unterscheidung von Erythro- und Cyanochromatin paßt.

Hagenau i. E., 26. Februar 1908.

L'Ancystropodium Maupasi (nov. gen. nov. sp.).

Par

E. Fauré-Fremiet

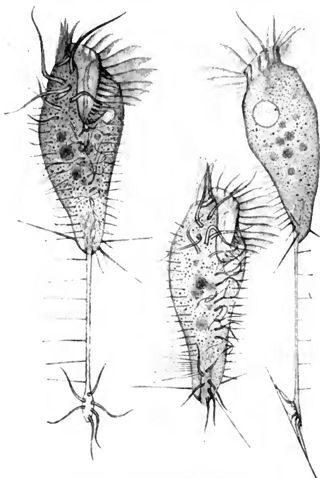
(Travail du laboratoire de Cytologie de l'École des Hautes Études au Collège de France).

(Avec 7 figures dans le texte.)

L'Infusoire qui fait l'objet de cette étude appartient à l'ordre des Hypotriches, famille des Oxytrichina (Ehrenberg), sous-famille des *Pleurotrichinae* (Bütschli). Il constitue un genre nonveau, que j'ai nommé *Ancystropodium* en raison de l'importance du rôle fixatenr dévolu à quelques uns de ses cirres, et une espèce nouvelle que M. E. Maupas a bien voulu me permettre de lni dédier.

L'*Ancystropodium Maupasi*, lorsqu'il nage, ressemble qnelque peu au *Stylonychia mytilus*; il mesure 110 μ de longueur sur 45 μ de largeur. Le corps n'est pas très épais; il est large dans ses régions antérieure et moyenne, pnis s'atténue progressivement jusqu'à l'extrémité postérieure. La face ventrale porte le péristome, profondément déprimé, et l'appareil vibratile. La face dorsale est quelque peu bombée dans sa région moyenne, tronquée par le passage de la frange adorale dans sa région antérieure, atténuée progressivement dans sa région postérieure. L'aspect de la partie antérieure de cet Infusoire permet de la différencier à premiére vue du *Stylonychia* par exemple; chez ce dernier en effet, le corps est trés plat et le péristome faiblement déprimé se termine antérieurement par le front, mince prolongement de la face ventrale derriére lequel passe la frange adorale. Chez l'*A. Maupasi* le corps présente au contraire une certaine èpaisseur, le péristome est profondément creusé et le

front qui le limite antérieurement est très développé; il forme une surface courbe à concavité ventrale et porte sur la face dorsale toute une portion de la frange adorale. Cette disposition particulière est en rapport comme nous le verrons plus loin avec le mode de vie de cet Infusoire. L'*Ancystropodium* en effet ne nage pas toujours; il peut se fixer à l'aide de ses cirres transversaux dont la disposition



Textfig. 1. *Ancystropodium Maupasi.*
Vu pendant la vie. A gauche: fixé; vu par la face ventrale. A droite: fixe; vue par le côté. Au milieu, nageant.

est assez particulière, et dans ce cas, un pédicule extrêmement contractile s'allonge entre le groupe des cirres transversaux et la région ventrale postérieure de l'organisme. Cette disposition représente l'exagération remarquable et unique croyons nous chez les Hypotriches, d'un phénomène très généralement répandu chez ces Infusoires: la fixation de l'organisme à l'aide de ses cirres transversaux.

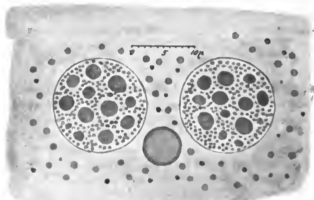
J'ai trouvé l'*Ancystropodium Maupasi* au mois de septembre 1907 dans un mélange de vase et de mousses immergées constituant une sorte de tourbière sur le bord de l'étang de Ponrras près de Rambouillet. J'avais conservé dans un petit cristallisoir une certaine quantité de ces détritus et de ces mousses qui renfermaient une grande quantité de Protozoaires et particulièrement d'Infusoires dont quelques uns étaient des formes rares ou même nouvelles.

L'*Ancystropodium* dont je n'ai vu qu'un petit nombre d'individus, une vingtaine environ, nageait avec rapidité au milieu des détritus et de corps divers, ou bien se fixant par ses cirres transversaux et développant son pédicule, se nourrissait des particules de toutes sortes et surtout des Bactéries ou des petits Flagellés qui étaient entrainés par son tourbillon.

Plusieurs fois j'essayai d'isoler des individus et de les cultiver, mais l'insuccès couronna toujours mes efforts. L'*Ancystropodium* ne peut vivre dans un volume d'eau aussi réduit qu'une goutte placée sur un porte-objet, car en plus de l'absence des conditions éthologiques normales, trop difficiles à réaliser dans ce cas, un phénomène purement physique vient entraver singulièrement la multiplication de cette espèce. On sait qu'un grand nombre d'Infusoires hypotriches sont extrêmement fragiles; dépourvus de toute espèce de tégument, limités uniquement par la tension superficielle du protoplasma et probablement aussi par une mince couche de substances lipoïdes, ces organismes éclatent avec une facilité déconcertante, ou bien se déforment complètement lorqu'on les soumet à l'action d'un réactif. L'*Ancystropodium* jouit de cette propriété, et bien souvent je l'ai vu disparaître, pulvérisé au simple contact de sa surface avec la couche superficielle de l'eau. Il était donc à peu près impossible dans ces conditions de cultiver cet Infusoire. Quant à la réserve contenue dans le cristallisoir, elle obeit aux règles générales du développement des infusions naturelles, c'est à dire que la lutte pour l'existence s'établissant aussitôt entre les habitants de ce petit monde fermé, les diverses espèces que le composent, après avoir joui successivement d'une certaine suprématie, disparaissent devant d'autres espèces ou par les variations chimiques du milieu. Huit jours après

mes premières observations il ne me restait plus un seul *Ancystropodium*. Je suis retourné un peu plus tard sur les lieux de ma première pêche mais je ne pus retrouver cette espèce. C'est pourquoi bien des points importants ne seront pas même effleurés dans la courte étude que je consacre à cet organisme; mais les faits que j'ai pu observer, quelqu' incomplets soient-ils, m'ont semblé assez intéressants en ce concerne la morphologie comparée des Infusoires hypotriches pour être publiés aujourd'hui.

Structure intime. — La structure intime de l'*Ancystropodium Maupasi* ne semble présenter aucun caractère particulièrement intéressant; je n'ai pu d'ailleurs l'étudier avec soin, et je me suis borné à reconnaître chez cette espèce pas un examen attentif effectué *in vivo* ce que j'ai pu étudier chez les autres.



Textfig. 2. *Ancystropodium Maupasi.*
Aspect du cytoplasme et de l'appareil nucléaire à un fort grossissement. On voit au milieu de la substance sarcodique homogène des grains réfringents et les sphéroplastes. Le macronucleus est formé par deux masses sphériques dans lesquelles on distingue les microsomes et les nucléoles. Le micronucleus au repos présente l'aspect d'une petite sphère hyaline.

Le cytoplasma de l'*Ancystropodium* apparaît comme une substance sarcodique homogène limitée par sa tension superficielle et peut être par une couche de nature lipoïde qui la sépare du milieu liquide sans constituer une membrane différenciée proprement dite. Cette substance renferme l'appareil nucléaire, l'appareil mitochondrial et des inclusions de nature diverse: corpuscules réfringents constitués sans doute par des produits d'excrétion, bols alimentaires, résidus de la digestion etc.

Appareil mitochondrial. — J'ai déjà longuement décrit les éléments sphérulaires ou sphéroplastes des Infusoires ciliés (Fauré-Fremiet 1907[a]); je ne reviendrai pas ici sur ce sujet et je rappellerai seulement que ces éléments, ordinairement acidophiles, peuvent être mis en évidence par les méthodes qui colorent les mitochondries de Benda et de Meves auxquelles je crois pouvoir les comparer. Ces éléments se multiplient par division et leur ensemble constitue l'appareil mitochondrial dont le rôle est encore inconnu.

Appareil nucléaire. — L'appareil nucléaire de l'*Ancystropodium* comprend le micronucleus et le macronucleus. Le micronucleus à l'état de repos est une petite sphère mesurant environ 6 μ de diamètre; limitée par une fine membrane, son contenu semble complètement homogène; il absorbe fortement le vert de méthyle.

Le macronucleus est constitué par deux masses sphériques mesurant chacune 15 μ de diamètre environ; elles sont indépendantes l'une de l'autre à l'état de repos, aucun filament ne les maintenant unies comme les deux masses nucléaires du *Stylonychia* par exemple. Chacune de ces sphères comprend une membrane périphérique turgescente enveloppant le suc nucléaire qui renferme des microsomes chromatiques, colorables par le vert de méthyle, et des nucléoles vrais, acidophiles, constitués par de la pyrénine. Les deux parties du macronucléus sont situées l'une au dessus de l'autre et le micronucléus se trouve entre les deux, rappelant ainsi une disposition bien comme chez certains *Loxophyllum*. Je n'ai pas observé les stades de division, mais il est bien probable que les deux sphères macronucléaires se fusionnent comme chez *Stylonychia* avant de se diviser.

Apparail vibratile ventral. — On sait combien la disposition de l'appareil vibratile est importante chez les Oxytrichides puisque toute la morphologie de ces Infusoires, si précise et si compliquée, repose sur la disposition des cirres ventraux. „Une bonne morphologie comparée, écrit Maupas (1883b, p. 530) ne peut s'établir qu'à l'aide d'une terminologie très exacte et basée sur une analyse aussi complète que possible des organes ou parties d'organes à comparer. Bien que dans un organisme aussi simple que celui des Infusoires la recherche des homologies ne puisse pas conduire à des résultats aussi considérables que chez les animaux d'une organisation plus complexe, cette méthode d'investigation n'en est pas moins très utile à appliquer ici et nous donne les moyens d'établir d'une façon plus solide les affinités et les relations entre les types d'un même groupe.“ Stein (1867), Sterki (1878) et Maupas (1883b) ont jeté les bases de cette terminologie nécessaire en répartissant

les cirres qui couvrent inégalement le face ventrale des Oxytriches en un certain nombre de groupes que je vais rappeler brièvement. Ce sont d'après Maupas: le groupe des cirres latéraux insérés sur l'aire latérale à droite du péristome; celui des cirres abdominaux constitué soit par quelques cirres isolés soit par des rangées parallèles occupant la région abdominale ou moyenne inférieure de l'Infusoire; puis celui des cirres transversanx, insérés sur une même ligne de directiou transversale, à la partie inférieure de la face ventrale; enfin le groupe des cirres marginaux, formant de chaque côté du corps une série régulière.

Bütschli (1887—1889) cherche à préciser davantage nos connaissances sur cette organisatiou en déterminant chaque cirre à l'aide d'une nomenclature alphabétique de sorte que chacun de ces éléments devienne une individualité dont on peut comparer la situation, la présence ou l'absence chez les différentes espèces. Cette nomenclature est possible parceque tous les cirres qui couvrent la face ventrale peuvent être considérés comme appartenant à un certaiu nombre de rangées parallèles. Mais il est souvent très difficile sinon impossible de déterminer à qnelle série appartient tel ou tel cirre, chez une espèce donnée, par le simple examen d'un individu; il existe donc une grande part d'arbitraire dans ces considérations morphologiqnes, et c'est ainsi qne la nomenclature des cirres ventraux de *Gastrostyla* est absolument fausse telle qn'elle est comprise par Bütschli.

Wallengren (1900[a]) a fait faire un très réel progrès à la morphologie comparée des Hypotriches en étudiant avec soin avant et pendant la division de l'Infusoire, la disposition des groupes de cirres de remplacement, déjà observés par Sterki. Dans son travail, Wallengren montre qne les cirres de nouvelle formation apparaissent sur l'aire latérale où ils forment six sangées parallèles, numérotées de gauche à droite à l'aide de chiffres romains. Chacune de ces séries comprend un certain nombre de cirres, nombre variable suivant les espèces. C'est ainsi que chez *Gastrostyla Sterkii* les cirres de nouvelle formation se répartissent ainsi: un pour la série I; trois pour les séries II et III; qnatre pour la série IV; cinq pour les séries V et VI. Chez *Gastrostyla setifera* les chiffres sont différents: un pour la série I; trois pour la série II; qnatre pour la série III; cinq pour la série IV; six ponr les séries V et VI. Chez *Stylonychia* on voit encore un cirre pour la série I, trois ponr les séries II, III et IV, et qnatre ponr les séries V et VI. D'après ceci, en comptant les cirres de chaqne série à partir de l'extrémité postérieure de celle-ci, on obtient ponr chaque élément vibratile une expression

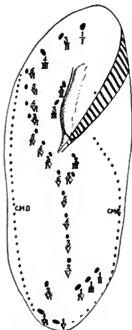
qui le caractérise rigoureusement et dans laquelle l'un des nombres, représenté par un chiffre arabe, exprime le numéro d'ordre dn cirre dans la série à laqnelle il appartient et que désigne l'autre nombre écrit en chiffres romains. Les cirres $\frac{2}{III}$ ou $\frac{4}{VI}$ par exemple sont ainsi parfaitement définis. Mais il est nécessaire pour établir cette nomenclature d'examiner les premiers stades du développement des groupes de remplacement, car les cirres vont occuper par la suite des positions fort différentes. Ils s'écartent les uns des autres jusqu'à ce que chaque série s'étende snr presque toute la longueur de la face ventrale de l'Infusoire, et ils s'égrènent différemment sur chacune d'elles. Chez *Gastrostyla setifera*, la cinquième série comprend d'après Bütschli un grand nombre de cirres abdominaux qui appartiennent en réalité à deux séries situées partiellement bout à bout; ils se décomposent en effet d'après Wallengren (voir fig. 3) de la manière suivante: $\frac{2}{V}$ $\frac{3}{V}$ $\frac{4}{V}$ $\frac{5}{V}$ $\frac{6}{V}$, $\frac{3}{IV}$ $\frac{4}{IV}$ $\frac{5}{IV}$, auxquels font même suite $\frac{3}{VI}$ $\frac{4}{VI}$ $\frac{5}{VI}$ et $\frac{6}{VI}$ de sorte que beancoup d'autenrs ont figuré une longue série de cirres abdominaux légèrement contournée en **S** et charactéristique du genre *Gastrostyla*.

Chez *Stylonychia mytilus* l'examen de la fignre 4 montre la disposition assez irrégulière des cirres dont la disposition en séries est peu compréhensible de prime abord chez les individns complètement développés.

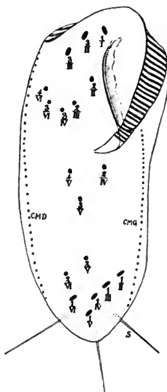
Je me suis étendn sur ces détails parceqne la disposition de l'appareil vibratile ventral de l'*Ancystropodium Maupasi* se rapproche étroitement de celles du *Stylonychia* et du *Gastrostyla*, et que n'ayant pas observé les stades de division, je ne puis l'expliquer qu'en la comparant à ces dernières.

Chez *A. Maupasi*, la première série de cirres ne comprend qn'un seul élément comme chez la majorité des Hypotriches (fig. 5); il est sitné sur le bord gauche antérieur de l'aire latérale. La deuxième série comprend le cirre transversal $\frac{1}{II}$ et les cirres latéraux $\frac{2}{II}$ situé au bord du péristome et $\frac{3}{II}$ situé à droite et au dessous de $\frac{1}{I}$. La troisième série comprend le cirre transversal $\frac{1}{III}$ situé au dessous de $\frac{1}{II}$ et les cirres latéraux $\frac{2}{III}$ et $\frac{3}{III}$ situés à droite et au dessous

de $\frac{2}{II}$ et $\frac{3}{II}$. La quatrième série est constituée par le cirre transversal $\frac{1}{IV}$ situé au dessous de $\frac{1}{III}$ et par les cirres abdominaux $\frac{2}{IV}$ $\frac{3}{IV}$ $\frac{4}{IV}$ et $\frac{5}{IV}$ formant une rangée légèrement oblique située au milieu de la face ventrale à droite de la bouche; le dernier élément de la série, $\frac{5}{IV}$ se trouve au dessous de $\frac{2}{III}$. La cinquième série comprend le cirre transversal $\frac{1}{V}$ situé au dessous de $\frac{1}{IV}$ et la série des cirres



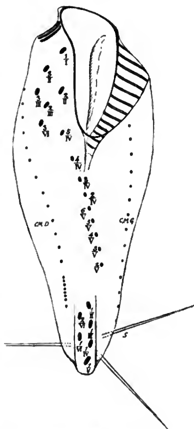
Textfig. 3.
Schéma montrant d'après Wallengren la distribution des cirres sur la face ventrale de *Gastrostyla setifera*.



Textfig. 4.
Schéma montrant d'après Wallengren la distribution des cirres sur la face ventrale de *Stylonychia mytilis*.

abdominaux $\frac{2}{V}$ $\frac{3}{V}$ $\frac{4}{V}$ $\frac{5}{V}$ et $\frac{6}{V}$ tous situés au dessous de la série $\frac{2}{IV}$ etc. et sur la même ligne que celle-ci. La sixième série enfin comprend le cirre transversal $\frac{1}{VI}$ situé à droite de $\frac{1}{IV}$ et le cirre $\frac{2}{VI}$ immédiatement au dessus; puis le cirre latéral $\frac{3}{VI}$ situé à droite et au dessous de $\frac{2}{III}$. Il faut ajouter à ces six rangées la série des cirres marginaux gauches (*CMG* fig. 4) et celle des cirres marginaux droits (*CMD* id.).

Le groupe des cirres frontaux de l'*A. Maupasi* ressemble beaucoup par sa disposition à celui dn *Stylonychia mytilus*. Comme chez ce dernier Infusoire il comprend tout d'abord, à la partie supérienre de l'aire latérale les trois gros cirres $\frac{1}{I}$ $\frac{3}{II}$ et $\frac{3}{III}$ qui présentent undéveloppement considérable pnisqu'ils mesurent environ 45 μ de long sur 2 de large à la base. Ils sont disposés suivant une ligne très oblique montant de droite à gauche; ils ne sont pas situés au dessous dn front comme chez *Stylonychia* à cause de la forme du péristome qui est profondément creusé, et le cirre $\frac{1}{I}$ se trouve au dessous de l'extrémité distale de la frange adorale, tout auprès d'nu rebord de l'aire léterale qui limite la cavité péristomienne. Au dessous de ces trois cirres très pnissants qni correspondent aux cirres frontaux de Stein



Textfig. 5.
Schéma montrant la distribution des cirres chez *Ancystropodium Maupasi*.

on voit les cirres latéraux $\frac{2}{II}$ et $\frac{2}{III}$ dans une position à peu près identique à celle qu'ils occupent chez *Stylonychia*: $\frac{2}{II}$ au bord de l'aire latérale à hauteur du péristome, et $\frac{2}{III}$ à droite et au dessous de $\frac{2}{II}$. Ces deux cirres sont moins puissants que les trois premiers et leur longueur atteint environ 25 μ (chez *Gastrostyla setigera* la disposition de ces gros cirres frontaux et latéraux est à peu près la même, mais le $\frac{3}{III}$ et le $\frac{2}{III}$ sont respectivement remplacés par le $\frac{4}{III}$ et le $\frac{3}{III}$ tandis que le cirre $\frac{2}{III}$ est reporté au dessous de la bouche dans la région abdominale). Au dessous et à droite du cirre $\frac{2}{III}$ on voit le cirre $\frac{3}{VI}$ dont la situation correspond à celle qu'il occupe chez *Stylonychia*; mais il n'est accompagné ni du cirre $\frac{4}{VI}$ ni du $\frac{3}{IV}$ car le premier n'existe pas chez *Ancystropodium* et le second occupe une situation très différente. A peu de distance de $\frac{3}{VI}$, entre cet élément et la bouche, on voit encore le cirre $\frac{5}{IV}$ qui fait défaut chez *Stylonychia* mais qui existe chez *Gastrostyla* à peu près dans les mêmes rapports avec le $\frac{3}{VI}$ et avec le péristome que chez *A. Maupasi.* Il se rattache étroitement par sa forme et la nature de ses mouvements au groupe des cirres latéraux; comme le cirre $\frac{3}{VI}$, le $\frac{5}{IV}$ mesure environ 17 à 20 μ de longueur. Les cirres $\frac{4}{VI}$ $\frac{5}{VI}$ et $\frac{6}{VI}$ qui existent chez *Gastrostyla setifera* font totalement défaut chez *Ancystropodium* comme chez *Stylonychia.*

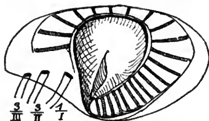
Le groupe des cirres abdominaux est presque identique chez *A. Maupasi* et *Gastrostyla setifera* et justifierait à lui seul le classement du premier dans le genre du second s'il ne se distinguait par la présence de son appareil fixateur. L'*Ancystropodium* possède en effet une série longitudinale et légèrement oblique de cirres qui occupe le milieu de la face ventrale. Je crois pouvoir décomposer ainsi

cette rangée qui correspond parfaitement à celle du *Gastrostyla setifera*: $\frac{2.\ 3,\ 4,\ 5,\ 6}{V}$, $\frac{2.\ 3 \text{ et } 4}{IV}$, le dernier, $\frac{5}{IV}$ appartenant par sa forme au groupe latéral. Il existe pourtant une légère différence entre la série abdominale de *G. setifera* et celle d'*A. Maupasi*; chez ce dernier les éléments de la Veme et de la IVeme série sont exactement situés dans le prolongement les uns des autres, tandis que chez le premier le cirre $\frac{2}{IV}$ se tronve à droite du $\frac{6}{V}$ et non point au dessns de lui, conservant ainsi une indication du parallelisme primitif des deux séries IV et V. Les cirres abdominaux de l'*Ancystropodium* sont longs d'un peu plus de 20 μ; ils sont très fins, très souples et formés de deux gros cils étroitement accolés à leur base et entièrement libre dans toute leur longueur. Ils sont animés de mouvements lents et semblent parcourus par des ondulations continuelles.

Le gronpe des cirres transversaux proprement dit est à peu près identique chez tous les Hypotriches Oxytrichides, c'est à dire qu'il est constitué par les cinq cirres $\frac{1}{II}$ $\frac{1}{III}$ $\frac{1}{IV}$ $\frac{1}{V}$ et $\frac{1}{VI}$; ils ne sont pas tonjours situés snr un même alignement; chez *Gastrostyla* et *Stylonychia* par exemple, $\frac{1}{II}$ $\frac{1}{III}$ et $\frac{1}{IV}$ forment une série oblique descendant de gauche à droite, tandis que $\frac{1}{V}$ est isolé un peu plus bas et que $\frac{1}{VI}$ se tronve un peu plns haut vers la droite. Cette disposition se retrouve nettement dans les cirres transversaux de l'*Ancystropodium*. Chez cet Infusoire, ces éléments occupent une sorte de petit plateau mince et long dont il sera question plus loin, et sont ainsi distribués: sur nn alignement longitudinal, du côté gauche, on trouve en descendant $\frac{1}{II}$ $\frac{1}{III}$ $\frac{1}{IV}$ et $\frac{1}{V}$, ce dernier situé tout à fait postérieurement comme chez *Stylonychia* et *Gastrostyla*; puis en remontant à droite on trouve $\frac{1}{VI}$, toujours comme chez les précédentes espèces. Au dessus de $\frac{1}{VI}$ on voit un gros cirre qui par sa structnre et surtout par son fonctionnement ne saurait être séparé des cirres transversaux auxquels il n'appartient pourtant pas; c'est le cirre $\frac{2}{VI}$ qui présente déjà chez un grand nombre d'Oxytriches un développement

particulier (*Gastrostyla*, *Stylonychia*, *Histrio* etc.). Les cirres transversaux de l'*Ancystropodium Maupasi* sont longs de 25 μ euviron, minces et trés mobiles. Nous revieudrons à leur sujet à propos de l'appareil fixatenr.

Appareil péristomien. L'appareil péristomien des Infusoires Hypotriches comprend le champ péristomien et la frange adorale. Chez *A. Maupasi*, le champ péristomien est fortement déprimé et constitne une cavité limitée à droite par uu rebord qui vient rejoindre à angle aigu l'aire latérale; à la partie supérienre ce rebord est rejeté en arrière et formant un demi-cercle tout en s'amincissant, il dessine uue sorte de col qui correspond au front des Oxytriches; il redescend à gauche et se confoud insensiblement avec le bord droit de la frange adorale; celle-ci est placée sur un plan héliçoïdal qui après avoir contourné la face dorsale du col limite le coté gauche dn champ péristomieu, puis s'amincissant peu à peu, pénètre à la partie inferieure de celui-ci au dessous de la surface veutrale de l'Iufusoire en formant la cavité pharyngienne qui se termine par le cytostome.



Textfig. 6.
Schéma montrant l'*Ancystropodium Maupasi* par sa face supérieure; on voit la cavité péristomienne et le trajet de la frange adorale.

La frange adorale est constituée par vingt-deux membranelles de grandes dimensions, mesurant près de 25 μ de haut sur 10 de large à la base; elles sont de forme triangulaire et formées par une donble rangée de cils fins étroitement accolés.

Le champ péristomien porte une rangée de cils paroraux qui pénétreut daus le cytostome; je n'ai pu m'assurer de la présence de plusieurs rangées paralléles comme il en existe chez beaucoup d'Hypotriches.

La vésicule contractile est située derrière la frange adorale à peu de distance des cytostome; son diamètre atteiut normalement 7 à 10 μ environ.

Apparail fixateur. — Maupas (1882, 1883 a et b) a montré que les organes vibratiles, cils ou cirres pouvaient servir dans bieu des cas à fixer l'Iufusoire à uu substratum quelconque; „les cirres transversaux des Hypotriches, dit il, paraissent s'être adaptés encore plus spécialement que les autres à nn rôle d'organe fixateur. Aussi voyous nous chez beancoup d'espèces, leur extrémité libre divisée en

fibrilles ou armées de petites pointes (*Euplotes patella*) qui multiplient les surfaces de contact et permettent à ces appendices de se fixer plus solidement sur les objets." Il est facile lorsqu'on examine un *Stylonychia* vivant, de voir cet organisme se fixer sur nn objet à l'aide du ses cirres transversaux, et déterminer alors dans le liquide environnant grâce au fonctionuement de sa frange adorale, un puissant courant alimentaire. M. Maupas n'a communiqné l'observation inédite d'une *Stylonichia* si bien fixée par ses cirres transversaux à une petite masse de zooglée qui les mouvements de la frange adorale entrainaient à la fois l'Infusoire et son support.

On voit d'aprés ces faits que pendant la fixation de ces Infusoires une traction, proportionnelle à la puissance de la frange adorale, doit s'exercer sur la région ventrale inférieure qui porte les cirres transversanx. Cette fonction de fixation, dévolue à certains éléments vibratiles a été l'origine chez l'*Ancystropodium* d'nne très remarquable adaptation.

Lorsque l'*A. Maupasi* nage librement, on pent observer à la partie inférienre de sa face ventrale une sorte de plateau saillant, large de 5 μ, long de 15 μ environ, dont les bords latéraux et inférieurs semblent rigides et dont le bord supérienr se fond insensiblement avec la face ventrale; ce plateau, que je nommerai le pied, porte les cirres transversaux dans l'ordre que j'ai indiqné plus haut. Le cytoplasme, au dessons de ce plateau apparaît *in vivo* finement strié dans le sens longitudinal (fig. 1). Enfin, à côté de cette région différenciée la série des cirres marginaux de droite se termine par huit éléments longs de 20 μ environ, très fins, d'aspect rigide, ressemblant ainsi à des soies tactiles et serrés les nns contre les autres. Sur la face dorsale, la région postérieure du corps présente trois soies identiques par leur nature et leur position à celle du *Stylonychia*, mais beaucoup plus grandes puisqu'elles atteignent 35 μ de longueur.

Lorsque l'Infusoire se fixe à un objet par l'intermédiaire de ses cirres transversaux qui sont très mobiles et orientés dans toutes les directions, on voit bientôt le pied se séparer dn corps sous la forme d'une plaquette ovale aux contours rigides reliée à l'organisme par nn mince cordon cytoplasmique d'aspect entiérement homogène. Ce cordon, ce pédicule, vient se fondre dans le cytoplasme de l'Infusoire et semble se continuer à l'intérieur de celui-ci par les fibrilles dont j'ai parlé plus haut. Quelle est la signification de ces fibrilles? sontce des éléments de sontien, quelque tonomitom comme il en existe chez les Vorticelles précisement à l'origine du pédicule, ou bien encore

un élément contractile? Je n'ai pu approfondir ces détails. Quoi qu'il en soit d'ailleurs, le pédicule de l'*Ancystropodium* jouit d'une très vive contractilité et celle-ci n'est pas incompatible avec l'absence de structure présentée par ce filament cytoplasmique; j'ai déjà montré que l'élément actif du pédicule des Vorticelles, le spasmonème est constitué par un plasma homogène légèrement réfringent, et j'ai montré que le pédicule contractile du *Tintinnidium inquilinum* (Fauré-Fremiet 1908) présentait une structure analogue. Le filament contractile de l'*Ancystropodium Maupasi* disparaît entièrement dans le cytoplasma somatique quand l'appareil fixateur est rétracté, et le pied se trouve étroitement appliqué contre le corps.

Le pédicule de l'*Ancystropodium* porte espacées sur toute sa longueur lorsqu'il est étendu. les huit soies que nous avons vu serrées pendant le repos à l'extrémité de la série des cirres marginaux droits. Il est fort probable que ces éléments jouent le rôle d'organes tractiles.

Lorsque l'*A. Maupasi* est fixé et présente son pédicule en extension, il ne reste pas nécessairement immobile; outre les mouvements continuels de contraction et d'extension du pédicule, les cirres transversaux peuvent se mettre à marcher. Ils fonctionnent en ce cas comme les cirres latéraux du *Stylonychia* pendant la marche, agissant les uns après les autres, ce qui leur est d'autant plus facile qu'ils jouissent d'une grande indépendance.

Dans une étude sur le *Tintinnidium inquilinum* (Fauré-Fremiet 1908) j'ai essayé de montrer comment deux Infusoires d'origine différente (un Tintinnoïdien et un Vorticellien), adaptés à un genre de vie particulier, caractérisé par la fixation, pouvaient se rapprocher par convergence jusqu'à devenir morphologiquement équivalents. L'*Ancystropodium Maupasi* plus éloigné encore d'une Vorticelle qu'un *Tintinnidium*, parceque plus spécialisé que celui-ci, n'en réalise pas moins avec des éléments très différents une structure équivalente. Il est intéressant de voir comment un organisme monocellulaire aussi différencié qu'un Infusoire oxytriche à pu réaliser brusquement une semblable adaptation que d'autres formes n'ont acquise que progressivement, avec des moyens un peu différents.

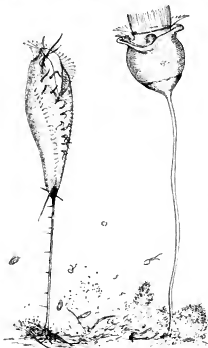
Je rappellerai tout d'abord l'existence depuis longtemps connue déjà d'un Infusoire aux affinités indécises que l'on a rattaché aux

Hypotriches et qui est curieusement adapté à la fixation. C'est la *Licnophora* qui compreud uu certains uombre d'espéces trés voisiues, toutes ectoparasites d'orgauismes littoraux. Je ne m'étendrai pas sur ces formes qui ont été remarquablemeut étudiées et qui, très éloignées tant par leur origine que par leur mode d'adaptation de l'espèce qui nous occupe ici, me semblent pouvoir être rapprochées des Tintinnoïdieus. L'*Ancystropodium* au contraire est un Oxytriche typique, très voisin comme nous l'avons vu plus haut des formes bien comme *Stylonychia* et *Gastrostyla*. Il ue se distinge de ces formes que par l'exagération du fonctionuement ordiuaire des cirres transversaux qui serveut uormalemeut comme on l'a vu, à la fixation temporaire de l'Infusoire. Et cette exagération, ce développement excessif d'une fonctiou ordinaire, s'accompagne de variations corrélatives qui impriment à tout ce petit organisme un cachet particulier.

Un détail frappe au premier abord lorsqu'on examine l'*Ancystropodium*: la région postérieure du corps, au lieu d'être encore large comme chez *Stylonychia* s'amincit rapidement surtout vers son extrémité, et les cirres transversaux se trouvent resserrés sur le pied suivant une disposition longitudinale; la région inférieure u'a plus d'autre raison d'être, chez cette espèce, que de servir de base à l'appareil fixateur; elle se trouve ainsi tout à fait spécialisée comme la région antérieure du corps chez les Vorticellides; je ne revieus pas ici sur l'existence d'un faisceau fibrillaire et d'un plasma trés contractile.

Chez les Infusoires fixés, le péristome tend à se placer dans un plan perpendiculaire au grand axe du corps passant par le point de fixation de façon que le courant alimentaire déterminé par l'appareil vibratile soit à peu près paralléle à cet axe. Peut-être faut il voir dans ce phénoméne un simple effet de la traction exercée par les mouvements vibratiles de l'appareil adoral sur le reste du corps; mais quoi qu'il en soit, cette disposition est a peu près générale. L'*Ancystropodium* n'y échappe pas et c'est ce qui différencie profondément la région antérieure de son corps de celle des autres Infusoires oxytriches. On a vu en effet que le corps de l'*A. Maupasi* est trés bombé dans sa région antérieure et que le péristome est profondément excavé; la frange adorale, dans la région où elle contourne le col, se trouve alors dans un plan perpendiculaire au grand axe de l'Infusoire. Les membranelles sont trés grandes, trés puissantes, et leur mouvement, au lieu d'entrainer un simple courant liquide comme chez *Stylonychia*, chasse l'eau tout autour de l'Infusoire

et détermine au dessus de celui-ci un vide qui est bientôt comblé par un courant liquide. Le fonctionnement de l'appareil adoral ressemble plus en un mot à celui d'un Péritriche tel qu'un *Stentor* et d'un Discotriche comme *Vorticella*, qu'à celui d'un Oxytriche comme *Stylonychia*.



Textfig. 7.
Aspect comparé d'un *Ancystropodium* et d'une *Vorticella*.

D'autres particularités accompagnent ces adaptations. On a vu que les cirres latéraux présentent un énorme développement; ces éléments s'agitent irrégulièrement et leur rôle semble se borner à renouveler le milieu liquide ou bien à s'ajouter à l'effet de la frange adorale. Ils ne semblent en aucun cas servir à la marche, qui est leur fonction principale chez les *Oxytrichinæ;* ce rôle est en effet dévolu chez l'*Ancystropodium* aux cirres transversaux et au cirre $\frac{2}{\text{VI}}$, c'est à dire au groupe des cirres pédieux. Les mouvements que ceux-ci effectuent pendant la marche sont de tous points comparables à ceux des cirres latéraux chez *Stylonychia*.

Je citerai enfin le développement considérable des soies tactiles qui est peut-être en rapport avec la grande excitabilité de cet Infusoire et la rapidité avec laquelle il contracte son pédicule ou quitte son support et se met à nager.

Si l'on compare l'*Ancystropodium* à une Vorticelle [1]) on voit que ces deux organismes dont la morphologie est fort différente sont arrivés à des résultats équivalents: fixés par l'intermédiaire d'éléments vibratiles postérieurs, la région inférieure de leur corps s'est

[1]) Je ne reviendrai pas ici sur l'origine de l'appareil fixateur des *Vorticellidæ* que j'ai exposé ailleurs (Fauré-Fremiet 1906).

différenciée jusqu'à donner naissance à nn organe complexe, rétractile. La région antérienre au contraire a pris nne plus grande importance et l'appareil péristomien présente une disposition qui lui assnre le meilleur rendement possible. L'un et l'autre de ces organismes, très sensibles, peuvent à la moindre excitation rétracter leur pédicule et échapper ainsi à un danger. Ce parallelisme rigoureux dans la constitution générale de deux organismes si différents me semble un fort argument contre la théorie de Bütschli (1886) qui cherche à placer l'origine des Vorticellides dans nne transformation compliquée d'un type Hypotriche. Il semble en effet qne ces derniers Infusoires aient atteint un degré de différenciation tel qn'il ne puissent plus acqnérir de caractères nouveaux importants; et, comme on le voit par l'exemple de l'*Ancystropodium*, l'utilisation et l'adaptation de leurs caractères actnels à nn mode de vie déterminé n'a pu réaliser qu'un type éqnivalent an type Vorticelle en exagérant encore les caractères pnrement Oxytriches.

20. Février 1908.

Index bibliographique.

Bütschli (1886): Versnch einer morphologischen Vergleichung der Vorticellinen mit verwandteu Ciliaten. in: Morphol. Jahrb. Bd. 11 p. 559.

— (1887—89): Bronn's Klassen nnd Ordnungen des Tierreichs. Protozoa p. 1246. Leipzig.

Fauré-Fremiet (1905): La structure de l'appareil fixateur ches les Vorticellides. in: Arch. f. Protistenk. Bd. VI p. 207.

— (1907 a): Mitochondries et sphéroplastes chez les Infnsoires ciliés. C. R Soc. Biol. t. LXII p. 523.

— (1907 b): L'organisation de l'Opercnlaria notonectæ. in: C. R. assoc. des Anatomistes. 9me réunion p. 111.

— (1907 c): L'Ancystropodium Maupasi. in: C. R. Soc. Biol. t. LXIII.

— (1908): Le Tintinnidium inquilinum. in: Arch. f. Protistenk. Bd. VIII.

Maupas (1882): Snr les Suctociliés de M. de Mereschkowski. in: C. R. Acad. Sciences Paris t. 95.

— (1883 a): Snr les Snctociliés de M. de Mereschkowski (2me Note). in: C. R. Acad. Sciences Paris t. 96.

— (1883 b): Contribntion à l'étude morphologiqne et anatomiqne des Infnsoires ciliés. Arch. Zool. expér. et génér. 2me Série t. 1.

Stein (1867): Der Organismus der Infusionstiere. Leipzig.

Sterki, W. (1878): Beiträge zur Morphologie der Oxytrichen. in: Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 31.

Wallengren, H. (1900 a): Zur Kenntnis der vergleichenden Morphologie der hypotrichen Infusorien. in: Bihang K. Sv. Vet. Akad. Handligar Stockholm Bd. 26.

— (1900 b): Studien ö. ciliata Infusorier. Lunds uuiversitets arssk Bd. 36 nnd Kongl. Fysiograf. Sällsk. Handlingar Bd. 11.

— (1901): Znr Kenntnis des Neubildnngs- nnd Resorptionsprozesses bei der Teilung der hypotrichen Infusorieu. in: Zool. Jahrb., Abt. Anat. u. Ontog. Bd. 15.

(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Würzburg.)

Über Fortpflanzungserscheinungen von Monocystideen des *Lumbricus agricola.*

Von
Richard Hoffmann, Würzburg.

(Hierzu Tafel IX und 6 Textfiguren.)

Die neuen Resultate über die Gregarinenentwicklung von Siedlecki und Cuénot haben die Veröffentlichung zahlreicher Arbeiten über Gregarinen veranlaßt. Auch die Monocystideen des Regenwurms sind seitdem von neuem untersucht worden, doch sind die vielerlei Fragen, die hier auftreten, noch weit von einer völligen Beantwortung entfernt. Besonders die neueren Arbeiten, die eine Anisogamie bei einigen Gregarinen feststellten, drängten zu einer Nachprüfung der Fortpflanzungserscheinungen, weil sich neue Gesichtspunkte für die Entwicklung der Monocystideen ergeben konnten. Leider war mir die Arbeit Brasil's (3) über die Monocystideen von *Lumbricus herculeus* Sav. entgangen, da ich sie wegen des ähnlichen Titels mit der anderen Arbeit Brasil's (2) über *Urospora* und *Gonospora* identifiziert hatte. Erst durch einen Zufall erfuhr ich beim Abschlusse meiner Arbeit von der Existenz der Arbeit Brasil's über die Lumbricusmonocystideen. Daher mußte ich in einem Teil meiner Arbeit nur eine Bestätigung der von Brasil gemachten Beobachtungen sehen und konnte auf die Wiedergabe einer Anzahl von Bildern verzichten, die ich für die Arbeit gezeichnet hatte.

Hinderlich bei meinen Untersuchungen war mir stets die Unmöglichkeit, die späteren Entwicklungsstadien systematisch unter-

scheiden zu können, was auch Brasil nicht gelang. Cuénot brachte ja durch seine Beschreibung der einzelnen Species wenigstens Licht in die Synonymie der Monocystideen, allein für die Unterscheidung der Cysten haben seine Untersuchungen keine Anhaltspunkte gegeben. Ich habe mich daher selbst bemüht, zur Förderung dieser Frage Beiträge zu liefern. Doch sind meine Ergebnisse noch zu unsicher, als daß ich jetzt schon darüber berichten könnte.

An dieser Stelle sei es mir gestattet, Herrn Prof. Dr. Th. Boveri, welcher mich zur Inangriffnahme der Arbeit veranlaßte, für die immerwährende Anleitung und das Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegenbrachte, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen. Ebenso hat mich Herr Assistent Dr. B. Zarnik durch manche, freundlichst erteilte Ratschläge zu vielem Dank verpflichtet.

Material und Untersuchungsmethoden.

Das zu untersuchende Material wurde aus möglichst frisch gesammelten Regenwürmern (nur *Lumbricus agricola*) durch Zerzupfen der Samenblasen oder der Samentrichter gewonnen. Die von Cuénot gemachte Angabe, daß alle Stadien der „Sporulation“ nur im Frühjahre häufig vorkommen, fand ich dabei bestätigt. Ich konnte bemerken, wie die Zahl der Syzygien im Verlaufe des Winters zunahm, um im Frühjahre ihren Höhepunkt zu erreichen. Im Sommer fanden sich Syzygien ganz vereinzelt, dafür Cysten mit reifen Sporocysten in Menge. Die freien Tiere und Cysten wurden entweder in der Samenblasenflüssigkeit untersucht, in der jedoch die vielen sich anheftenden Lumbricusspermien sehr störend waren, oder in künstliche Untersuchungsmedien gebracht. Ein der Samenblasenflüssigkeit vollkommen äquivalentes Medium zu finden, gelang mir nicht. Die besten Resultate ergaben noch die Ringer- und Locke'sche Lösung. Doch blieben Syzygien, die in Gametenbildung begriffen waren, auch darin nicht allzulange normal, während einzelne freie Tiere in manchen Fällen noch nach 36 Stunden Leben zeigten. Das Deckglas wurde mit einem Rand von Vaseline umgeben. Wachs bewährte sich nicht so gut. Beim Erkalten hebt sich das Wachs unter dem wechselnden Druck der Immersion häufig etwas von den Glasflächen ab, so daß man nie vor undichten Stellen sicher sein kann. Wenn aber nur eine geringe Menge Wasser verdunstet, wird die Veränderung der Konzentration der Untersuchungsflüssigkeit für die

Objekte gefährlich. Einen verderblichen Einfluß anf die normale Entwicklung des Cysteninhaltes gewinnen anch häufig auftretende Bacterien. Trotzdem das zu Untersuchungslösungen verwendete destillierte Wasser sterilisiert und Objektträger wie Deckgläser vor dem Gebrauch ausgekocht wurden, gelang es selten, das Auftreten der Bacterien hintanzuhalten. Was die Färbung anlangt, so eignet sich für viele Zwecke die Behandlung der frischen Tiere mit Essigkarmin nach Schneider sehr gut, bloß muß man in Betracht ziehen, daß dabei Quellungen des Plasmas hervorgerufen werden. Da durch die Cystenmembran der Farbstoff nur sehr langsam eindringen kann, ist es vorteilhaft, durch vorsichtiges Klopfen auf das Deckglas in der Membran einen Riß hervorzurufen.

Die Fixierungsmethoden müssen je nach dem Stadium des Objektes verschieden gewählt werden. Handelte es sich um freie Tiere oder jüngere Syzygien, konnte Pikrinessigsäure mit Erfolg angewendet werden. Für Cysten, in denen die Gameten gebildet waren, lieferte Rabl'sches Gemisch gute Resultate. Handelte es sich um Zygoten mit fertiger Membran, so erfüllten nur rasch eindringende Gemische wie das von Petrunkewitsch oder eine Mischung von einem Teil konzentrierter Essigsänre und drei Teilen absoluten Alkohols ihren Zweck. Einzeln konservierte Gregarinen und Syzygien wurden mit Boraxkarmin nach Greenacher in toto gefärbt und durchgemustert, manche darauf im Bedarfsfalle eingebettet und geschnitten. Zur Einbettung dieser kleinen Objekte wurde die Methode von Boveri, die Objekte in eine zarte Haut einzuwickeln, oder die Ulvamethode von Yatsu angewendet. Leichter zu behandeln sind allerdings stark infizierte Lumbricussamenblasen, welche alle Entwicklungsstadien sicher enthalten, wenn sie in der richtigen Jahreszeit im ganzen konserviert werden. Für die Schnittfärbung tat Hämalaun nhch Mayer, danach Eosin gute Dienste. Sehr vielfache Anwendung fand auch Heidenhain's Eisenhämatoxylin.

Die Kernteilungen im Syzygium.

Die ersten Teilungsfiguren.

Bekanntlich wurde die von Wolter's (18) behauptete Conjugation der paarweise encystierten Gregarinen durch die späteren Forschungen nicht bestätigt. Anstatt daß die Kerne eines jeden Syzygiten nach der gemeinsamen Trennungslinie wandern, um hier zu verschmelzen,

nach dem Austausche ihrer chromatischen Elemente sich wieder zu trennen und getrennt zur Teilung zu schreiten, findet zwischen den beiden Syzygiten weder Plasto- noch Caryogamie statt. Dieses von Siedlecki (12) zuerst bei *Monocystis ascidiae* gefundene Verhalten der Syzygiten wurde dann auch von Cuénot (6) und Prowazek (11) für die in *Lumbricus* vorkommenden *Monocystis*-Arten bestätigt. Cuénot fand, daß zuerst die Nucleoli im Syzygitenkern eine Veränderung durchzumachen haben. Sie werden kleiner, zerfallen und lösen sich zum Teil im Kernsaft auf. Es kommt dann innerhalb der Kernmembran zur Entstehung des „micronoyau", des eigentlichen teilungsfähigen Kernes, der von typischen, sich intensiv färbenden Chromosomen gebildet wird. Gleichzeitig hat sich im Cytoplasma neben dem Kerne ein „amas archoplasmique", eine Astrosphäre gebildet, die sich wahrscheinlich in zwei teilt, denn Cuénot fand Kerne, an deren Membran sich zwei Sphären gegenüberlagen. Die Chromatinkörner des Micronucleus bilden die Äquatorialplatte der zwischen den beiden Sphären entstehenden Spindelfigur, während die Kernmembran kurze Zeit später vollkommen verschwindet. Der oder die Nucleolen des ursprünglichen Gregarinenkerns gelangen dadurch in das Cytoplasma, wo sie sich nach und nach auflösen.

Prowazek kam zu ähnlichen Resultaten. Nach der Encystierung oder schon knapp vorher konnte er im Kern der Syzygiten einen Zerfall des Innenkörpers (Nucleolus Cuénot's) konstatieren. Der Kern wurde in seiner Form mehr oder weniger unregelmäßig. Auf Totopräparaten fand Prowazek, „daß er sich gleichsam gegen das Centrum der Cyste zu öffnet und etwas von seinem Inhalt in einer unklaren streifigen Form an den Zelleib abgibt". Darauf soll sich die Kernwand vielfach schließen und auf Schnitten neben dem Kern mit seinem zerfallenen Innenkörper und chromatischen Schollen ein „Bläschen" zu finden sein. Dieses Bläschen, Prowazek nennt es später Kleinkern, soll dunklere Substanzen austreten lassen, die sich zu Strahlenfiguren umbilden. Ein zwischen den Strahlenfiguren liegendes „undeutliches dunkles Streifengebilde" deutet Prowazek für eine Centralspindel.

Die Arbeit Cecconi's (5), deren Figuren auf schlecht konserviertes Material zurückzuführen sein dürften und sehr schematisch gehalten sind, bietet keinen bemerkenswerten Aufschluß über die Entstehung der ersten Teilungsspindel. Ohne die Bildung derselben beobachtet zu haben, glaubt Cecconi, die von Siedlecki [1]) bei *Monocystis ascidiae*

[1]) Siedlecki (12) nahm bei *Monocystis ascidiae* aus *Ciona intestinalis* an den Syzygitenkernen Veränderungen wahr, wobei das Caryosom (Nucleolus) inner-

gefundenen Verhältnisse auch für *Monocystis agilis* bestätigen zu können.

Die zitierten Forschungsergebnisse kommen also bei der Caryokinese der Regenwnrmmonocystideen in der Hauptsache zn einem gleichen Resultat. Sie ergeben eine in jedem Syzygiten unabhängig verlaufende Kernteilung nnd stellen für den Gregarinenkern vegetative und generative Bestandtteile fest. Bezüglich der Details ist zwischen Cuénot nnd Prowazek jedoch keine Übereinstimmung zn verzeichnen. Der Unterschied der beiden Berichte verdient deshalb hervorgehoben zu werden. Die Lage der ersten Teilungsspindel ist nach der Auffassung der beiden Antoren eine verschiedene. Nach Cuénot entsteht die erste Teilungsfigur am und im ursprünglichen Kern des Syzygiten, nach Prowazek dagegen liegt sie anßerhalb der Kernmembran im Plasma, indem sich das ansgestoßene „Bläschen“ dazu nmbildet. Das Bläschen Prowazek's ist streng genommen dem Micronucleus Cuénot's nicht gleichwertig, Es entspricht vielmehr dem „micronoyau“ und dem „amas archoplasmique“ Cuénot's.

Leider hatte ich unter meinen Schnittserien nur wenige Stadien, welche die erste Teilnng betrafen, doch stimmten die wenigen mir vorgelegenen Fälle mit der Auffassung Cuénot's überein. Über die Entstehung der ersten Sphäre kann ich nichts Positives behaupten, da ich dieselbe in meinen Präparaten nicht zu Gesicht bekam. Brasil (3) war in dieser Beziehnng glücklicher, indem er die Entstehnng der achromatischen Figur der ersten Kernteilnng verfolgen konnte. Ein „Centriol“, das vorher mit der Kernmembran verschmolzen sein soll, hebt sich von ihr ab, bleibt aber noch durch einen Teil dieser Membran, welchen es mit einer geringen Menge von Intranuclearsubstanz hinter sich nachzieht, mit dem Kern in Verbindnng. Dadnrch ist es znr Bildung eines Attraktionskegels gekommen, an dessen Spitze nach Baasil das stark färbbare punktförmige Centriol liegt, das zugleich das Centrum einer deutlichen Strahlung bildet. Der Attraktionskegel teilt sich hierauf in zwei, welche an der Kernmembran auseinanderrücken, bis sie sich fast

halb der Kernmembran anf die Seite geschoben wurde. In einer im Kerninnern entstehenden Vacnole, die mehr und mehr wächst, wurde das Chromatin des Kernes mit Ansnahme von einigen gröberen Brocken aufgenommen. Die schließlich den ganzen Kern ausfüllende Vacnole bringt die Kernmembran zum Platzen und der ganze Kerninhalt kommt in das Plasma zn liegen. Gleichzeitig bildet sich aus „den wenigen gröberen Chromatinstückchen ein neuer, verhältnismäßig winziger Kern, der bald unter dem Bilde einer sehr kleinen caryokinetischen Figur auftritt“.

gegenüberliegen. Hierauf durchsetzen Radien der Polstrahlungen den Kern. Die erste Teilungsspindel entsteht nnn im ursprünglichen Kern, dessen nicht in die Teilungsfigur übergegangenen Reste sich neben oder im Umkreis der Spindel vorfinden. Die Darstellung Cuénot's findet also durch Brasil ihre Bestätignng.

Auch ich konnte mich überzeugen, daß die achromatische Figur der ersten Teilungsspindel tatsächlich am nrsprünglich vorhandenen Syzygitenkern entsteht, während sich das teilungsfähige Chromatin noch innerhalb der intakten Kernmembran befindet. Fig. 1 stellt zwei aufeinanderfolgende Schnitte durch den sich zur Teilung anschickenden Kern eines kleinen Syzygiums dar. Der Nucleolus (Fig. 1b) ist bei Heidenhain's Eisenhämatoxylinfärbung schwach tingiert. Von den stärker gefärbten Gebilden dürften sich einige durch ihre regelmäßige Gestalt als Chromosomen erweisen.

An der Kernmembran (Fig. 1a) liegen zwei Sphären, zwischen denen sich später die Spindelfigur ausspannen wird. Die Tochterplatten der ersten Teilungsfigur werden oftmals weit auseinander befördert, was für eine gleichmäßige Verteilung der Kerne im Zelleib sehr vorteilhaft ist. Gewöhnlich liegen die langen Spindeln sehr nahe der Oberfläche der Syzygiten, sind infolgedessen gekrümmt, anßerdem weisen sie häufig eine Torsion auf. Die Chromosomenzahl sicher festzustellen, wollte mir nicht gelingen. Die Beschaffenheit der Spindelpole ist je nach den Arten verschieden, was auch Cuénot schon betonte. Brasil wies drei verschiedene Typen von Teilungsfignren nach, die sich hauptsächlich dnrch die Beschaffenheit der Chromosomen und der Polstrahlungen unterscheiden. Allen Spindelpolen sind mehr oder weniger deutliche Polstrahlungen eigen, in deren Centren Brasil „Centriolen“ findet, die sich schon während der Tochterplattenbildung verdoppeln.

Eine Spindel, wie ich sie in einem Totalpräparate vorfand, ist in Fig. 3 dargestellt. Ich teile diese Fignr mit, weil die Strahlungen viel mächtiger entwickelt sind, als in Fig. 14 Brasil's. Die Chromosomen konnte ich nicht zur Anschauung bringen. Einen anderen Typus, welcher an die sich teilenden Micronuclei der Ciliaten erinnert, fand ich häufiger. Die in der Mitte der tönnchenförmigen Teilungsfiguren annähernd parallel verlaufenden Spindelfasern endigen in dichteren Polknöpfen, ohne jede Spur von Polstrahlungen. In den Polknöpfen konnte ich nie Centrosomen oder Centriolen nachweisen. Leider bin ich momentan nicht in der Lage, die von Brasil benutzten Fixierungs- und Färbungsmethoden anzuwenden, um nachzuprüfen, ob dadurch bei den eben beschriebenen Spindeln nicht doch eine

Polstrahlung zu sehen wäre. Doch glaube ich, daß auch bei dem von mir benutzten Fixiergemisch von Rabl die Polstrahlungen, wenn überhaupt vorhanden, erhalten geblieben wären.

In den regulären Strahlungsfiguren gelang es mir einige Male, mit Eisenhämatoxylin ganz scharf umschriebene Körperchen darzustellen, von denen schwer zu sagen ist, ob es Centrosomen oder Centriolen sind. Doch ist nach ihrer Größe das letztere wahrscheinlicher. Auch spricht die Gestalt der dunklen Körperchen in den Sphären der Fig. 2 dafür, daß es sich hier um Verdopplung von Centriolen handelt. Da die Differenzierung nicht so leicht ist, erging es mir oft wie Prowazek, der in seinen polaren centrosphärenartigen Verdichtungen „nach scharfen Differenzierungen kein eigentliches Centrosoma oder eine Centriole“ finden konnte.

Welches die genanen Schicksale der nucleolenartigen Gebilde sind, die bei einigen Arten nach jeder Teilung in den Kernen wieder auftreten und ob dieselben den im ursprünglichen Kern vorhandenen Nucleolen entsprechen, ist nicht hinreichend sichergestellt. Die Annahme Schellack's (13), daß ein dem ursprünglichen Nucleolus (Caryosom) entsprechendes Gebilde in den Kernen der *Monocystis*-Arten später nicht mehr auftritt, ist jedenfalls noch unbewiesen. Es scheint Schellack entgangen zu sein, daß schon Cuénot sagt: „après chaque division les noyaux se reconstituent et reviennent au repos; ils renferment alors des grains de chromatine épars, et chez quelques espèces des nucléoles vacuolaires, prénants mal les couleurs, qui me paraissent rappeler beaucoup, par leur composition chimique, le gros nucléole des Grégarines.“ Brasil (3) findet bei keiner Art der von ihm untersuchten Monocystideen nach der ersten Teilung in den Kernen voluminöse Nucleolen. In seiner Fig. 16 scheinen indessen kleinere nucleolenartige Bildungen vorhanden zu sein. Meine eigenen Beobachtungen über diesen Punkt werden später erwähnt werden.

Die letzten Kernteilungen vor der Gametenbildung.

Übereinstimmend wurde von Wolters, Cuénot und Prowazek beschrieben, daß die letzten Kernteilungen an der Peripherie der Syzygiten vor sich gehen. In der Fig. 20 Cuénot's und 10 Prowazek's kann man diesen Vorgang abgebildet sehen. Es scheint die Meinung zu bestehen, daß, wenn sich an der Peripherie der Syzygiten eine Plasmaportion vorwölbt, dies der Akt der Gametenbildung sei. Meine Untersuchungen ließen jedoch erkennen, daß schon während der letzten Teilungen die Kerne aus dem Plasma

heraustreten. Diesen Vorgang vermochte ich im Leben zu verfolgen. Er spielt sich folgendermaßen ab:

Zuerst sieht man kleine kegelförmige Gebilde aus dem Zelleib hervorkommen, die allmählich nachfolgenden größeren rundlichen Körpern aufsitzen (s. Textfig. 1). An manchen der rundlichen Körper sind bald zwei nebeneinanderliegende kegelförmige Gebilde wahrzunehmen. Läßt man Essigkarmin unter das Deckglas treten, so kann man sich überzeugen, daß die rundlichen Körper Kerne sind, in denen das Chromatin je nach dem Stadium des Kernes verschieden geordnet ist. Die kegelförmigen Gebilde sind die schon bei der ersten Teilung erwähnten Attraktionskegel.



Textfig. 1 (1300 ×).

Solche Attraktionskegel sind bei Gregarinen wohl zuerst (1903) von Léger und Duboscq (8) bei *Pterocephalus nobilis* gesehen worden, denn sie beschreiben einen „appareil conique sidérophile“, geben aber keine deutlichen Abbildungen. Diesen Attraktionskegeln an die Seite zu stellen sind die von Schellack (13) bei *Echinomera* gefundenen Gebilde. Bei Monocystideen hat zuerst (1905) Brasil (2) Attraktionskegel bei *Urospora* und *Gonospora* gefunden. Sehr ähnlich sind die von demselben Autor (3) auch bei Lumbricusmonocystideen beschriebenen Attraktionskegel.

Ich selbst studierte die Polkegel an den späteren Kerngenerationen verschiedener *Monocystis*-Arten. Da sich die Vorgänge in den Kernen der kleineren Arten wegen ihrer winzigen Elemente zu schwierig verfolgen lassen, will ich mich eingehender nur mit einer größeren Cyste befassen, die ich in einer Samenblase gefunden habe. Vor allem ist zu erwähnen, daß außer den typischen generativen Kernen auch noch größere Kerne vorhanden waren, also ein Verhältnis, wie es Léger (7) bereits bei *Stylorhynchus* beschrieben hat. Ich will deshalb die größeren Kerne zum Unterschied von den kleineren Kernen auch „somatische“ Kerne nennen, obwohl ich nicht sagen kann, ob sie eine besondere atypische Mitose aufweisen, wie es nach Léger bei *Stylorhynchus* der Fall ist, da ich sie nicht in Teilung gesehen habe.

Die somatischen Kerne (Fig. 20, 21) enthielten außer ziemlich gleichmäßig verteilten dunklen Strängen einen größeren oder mehrere kleinere mit Vakuolen versehene Nucleolen. Die beträchtliche Größe

dieser Kerne den generativen Kernen gegenüber läßt annehmen, daß sie schon seit einiger Zeit nicht mehr znr Teilnng geschritten nnd als der Degeneration verfallende Kerne aufzufassen sind. Degenerierende Kerne findet man häufig auch noch in den Restkörpern kleinerer Syzygiten, welche bereits Gameten hervorgebracht haben. Cuénot faßt sie als Kerne anf, welche sich nicht znr richtigen Zeit entwickelt haben, hypertrophisch geworden und der Degeneration geweiht sind. Brasil (3) ist derselben Meinung.

Die vorgefundenen generativen Kerne (Fig. 4—12) lagen nicht alle an der Peripherie ihres Syzygitenkörpers, sondern befanden sich zum Teil noch in seinem Innern. Die meisten derselben waren bipolar und wiesen neben verschieden geformten nnd verschieden großen Chromatinfäden einen Nucleolns anf. Die Polkegel waren vom eigentlichen Kerne scharf abgesetzt und schienen manchmal nur an der Basis in die Kernmembran etwas eingesenkt zn sein. Durch sorgfältiges Differenzieren konnte etwas unterhalb der Kegelspitze ein kleines Körperchen in Form eines kleinen Striches oder Punktes sichtbar gemacht werden, das ich vorläufig als Centriol bezeichnen will (s. Fig. 10). Dieses Centriol lag also im Polkegel, während andere Autoren — hier sind außer den Figuren Brasil's (2 n. 3) besonders Fig. 31 nnd 32 Schellack's zum Vergleiche heranzuziehen — das Körperchen der Kegelspitze gleichsam aufgelagert finden. Ein größerer Unterschied zwischen den bereits bekannten Attraktionskegeln nnd den bei der vorliegenden Art vorhandenen Polkegeln scheint mir in dem Mangel jeglicher Strahlnng an ihrer Spitze zu liegen. In den gewöhnlich dunkler gefärbten Polkegeln war keine weitere Strnktur zu bemerken.

Solange ein Kern nnr einen Polkegel aufweist, liegen die Chromosomen zunächst noch an der Polseite des Kernes (Fig. 4). Wenn sich der Polkegel zur Teilnng anschickt nnd die Teile an der Kernmembran auseinanderrücken, verbreitet sich das Chromatin nach und nach im ganzen Kern (Fig. 5—9). Ein Nucleolus tritt auf, der allerdings nur so lange leicht gefnnden werden kann, als die einzelnen Chromosomen noch deutlich zu erkennen sind, während er später in dem dichten Chromatinknäuel leicht zu übersehen ist. Liegen sich die beiden Polkegel an der Kernmembran ungefähr gegenüber, dann bilden sich die nnregelmäßig gewordenen Chromatinbestandteile wieder zu typischen Chromosomen um und lagern sich in der Kernmitte znsammen (Fig. 10—12). Auf diesem Stadium ist der Nucleolns nicht mehr nachweisbar. Die Polkegel verlieren ihre scharfe Abgrenznng gegen den Kern nnd man kann die Centriolen

in helleren Bezirken liegen sehen, von welchen Spindelfasern nach den sich zur Äqnatorialplatte umordnenden Chromosomen verlaufen (Fig. 13 n. 14). Die Teilung der Chromosomen erfolgt dnrch Längsspaltung. Die Spaltung beginnt an einem Ende, am anderen hängen die Tochterchromosomen noch einige Zeit zusammen (Fig. 15). Gleichzeitig mit der Tochterplattenbildung haben sich oft die Centriolen verdoppelt, wie aus Fig. 15 u. 17 ersichtlich ist. Gewöhnlich erleiden die Spindeln eine Torsion (Fig. 18). Die Kernmembran kann sich um die Tochterkerne schließen, während zwischen ihnen, wie in Fig. 19, noch Spindelfaserreste sichtbar sind. Merkwürdig ist, daß sich nach der Teilnng der Polkegel nicht abrundet, wie es bei *Urospora* von Brasil beschrieben wurde, sondern seine Gestalt beibehält. Bei der Mitose fand ich keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein eines unpaaren Chromosoms, aus dem sich der in den Tochterkernen später wieder auftretende Nucleolns in der von Schellack (13) bei *Echinomera* beschriebenen interessanten Weise rekonstruieren könnte.

Ein zweites gleichgroßes Syzygium ebenfalls mit „somatischen" Kernen, die mir ein Artcharakteristikum zu bilden scheinen, zeigte mir, daß bei der vorliegenden großen Monocystidee mit der fortschreitenden Kernteilnng eine auffallende Lappung der Syzygitenkörper erfolgt. Auf Schnitten (s. Fig. 22) scheinen die Syzygiten aus isolierten Stücken zu bestehen, die von den generativen Kernen umsänmt werden, während in ihrem Innern die unveränderten „somatischen" Kerne liegen. An den generativen Kernen finde ich keine Polkegel mehr, was wegeu ihrer Kleinheit nicht zu verwundern ist.

Ein besonderer Teilungsmodus bei der Kernvermehrung der Syzygiten.

Wie sehr man sich vor Verallgemeinernngen hüten muß, selbst wenn es sich um so nahe verwandte Arten handelt, wie sie wohl in den Regenwurmmonocystideen vorliegen, zeigt ein Fnnd, der beweist, daß der Teilungsprozeß der Kleinkerne eines der Regenwurmparasiten nicht unbeträchtliche Unterschiede darbietet.

In einem großen Syzygium, offenbar von *Monocystis herculea* Bosanquet, war die Kernteilung schon weit fortgeschritten. Die zahlreichen kleinen Kerne lagen alle im Plasma der beiden Syzygiten regellos verteilt. Somatische Kerne waren nicht vorhanden. Was die Kerne von den früher beschriebenen unterscheidet, ist die Form der chromatischen Substanz nnd die Anwesenheit zweier intranncleärer Centrosomen. In Fig. 23 ist einer der typischsten Kerne

abgebildet. Innerhalb der auf dem Schnitte ungefähr kreisrunden Kernmembran liegt, derselben häufig angeschmiegt, ein Chromatinklumpen, der sich sowohl bei Hämalaun- als auch Eisenhämatoxylinfärbung als ein die Farbe stark aufnehmender Körper darstellen, aber gewöhnlich keine Struktur erkennen ließ. Außer diesem Körper, der nach seinen Schicksalen als Chromatinnucleolus aufzufassen ist, wurden im Kerne bei stärkerer Behandlung mit Eisenhämatoxylin auch noch dunkle Filamente gesehen (s. Fig. 24), die jedoch mit der chromatischen Substanz nichts zu tun zu haben scheinen. Dem Nucleolus gegenüber ragen zwei halbkugelige Gebilde in den Kernraum hinein, in deren Centren bei stärkerer Differenzierung des Eisenhämatoxylins kleine Punkte, die Centrosomen, sichtbar gemacht werden können. Warum ich diese Gebilde nicht im ganzen als Centrosomen und ihre Centren Centriolen nenne, wird weiter unten erörtert werden. Differenziert man weniger stark, so kann man die Centrosomen mit dem sie umgebenden Hofe in tiefer Schwarzfärbung bekommen (Fig. 24, 25, 33). Ich habe im Vorhergehenden die Centrosomen als intranucleäre bezeichnet, weil sie nicht etwa nur in einer Einsenkung der Kernmembran liegen, sondern im Ruhestadium mit dem Nucleolus von der Kernmembran umschlossen werden. Nur ist da, wo sie der Kernmembran anliegen, die Abgrenzung viel weniger deutlich. Im Cytoplasma befindet sich an dieser Stelle eine gut erkennbare Strahlung. Zwischen den intranucleären Plasmaansammlungen kann man oft (z. B. Fig. 24, 33) Reste einer ehemaligen Verbindung erkennen. Wie die Bildung der Chromosomen vor sich geht, konnte nicht gut verfolgt werden. Vermutlich ist die Einzahl des Nucleolus die normale. Dieser scheint sich dann in zwei oder mehrere Teile zu trennen, deren Gefüge sich auflockert und in kleinere Chromatinbröckchen zerfällt. Gleichzeitig mit der Auflösung der Chromatinmasse in ihre kleineren Bestandteile verlieren die umkleidenden Hüllen der Centrosomen ihre Kugelgestalt, wie aus Fig. 27, die einen angeschnittenen Kern darstellt, hervorgeht. An der Peripherie treten Strahlen auf, die, wenn länger geworden, mit den Chromatinbröckchen in Verbindung treten (Fig. 28). Die dadurch entstehende intranucleäre Spindel (mit cytoplasmatischen Polstrahlungen) scheint sonach ganz aus der umkleidenden Substanz der Centrosomen hervorzugehen. Die Centrosomen rücken allmählich auseinander, aber nicht allzuweit. Dabei wird das Kernbläschen einseitig abgeplattet (Fig. 26, 29). Dementsprechend entwickelt sich die Spindel nie gestreckt, sondern gekrümmt und behält diese Form auch später bei. In Fig. 30 tritt die Krümmung nicht hervor, weil die optische Ebene

nicht mit der Krümmungsebene zusammenfällt. Die Spindel füllt übrigens das Kernbläschen nicht ganz aus. Auf Stadien wie Fig. 29, 30 finden sich die Plasmaansammlungen bedeutend kleiner und über den Kern nach außen vorspringend. Die Kernmembran selbst ist an der sich streckenden Teilungsfigur später nicht mehr deutlich zu unterscheiden. Wie die Tochterplatten gebildet werden, konnte wegen der Kleinheit der Chromosomen nicht verfolgt werden. Da sie die Eisenhämatoxylinfarbe in späteren Stadien beim Differenzieren viel leichter abgeben als die Spindelfasern, so kann man in gut differenzierten Teilungsfignren ihre Lage gewöhnlich nur noch angedeutet finden (Fig. 31). In dieser Fignr sieht man im Centrum der Polstrahlungen je ein kleines scharf begrenztes Körperchen (Centrosom), an das die Radien der Polstrahlung herangehen. Eine homogene Umhüllungssubstanz, wie in Fig. 23, ist nicht mehr nachznweisen, sie scheint also bei der Spindelbildung aufgebraucht zn sein. Auf Grnnd dieses Entwicklungsganges sehe ich mich veranlaßt, nur die Centren der in Fig. 23 vorhandenen halbkngeligen Gebilde Centrosomen zu nennen. Die Separation der Centrosomen einer jeden Polsphäre erfolgt bereits im Spindelstadium, wie aus Fig. 32 ersichtlich ist. Deshalb ist es auch erklärlich, warnm in den jüngsten ruhenden Kernen immer zwei Centrosomen zu finden waren. In Fig. 33 sind zwischen zwei eben gebildeten Tochterkernen noch Spindelfaserreste vorhanden. Die Membran des oberen Kernes nmschließt schon wieder die zwei Plasmaansammlungen, die noch durch einen Stiel miteinander in Verbindung stehen, während der untere Kern etwas znrück ist. Der Nucleolus ist in beiden Kernen noch nicht gebildet.

Der ganze Teilungsvorgang erinnert sehr an den von Brasil (3) beschriebenen ersten Typus. Besonders die Fig. 18 Brasil's zeigt eine gewisse Ähnlichkeit der dort abgebildeten kleinen Kerne mit den hier beschriebenen. Nnr die Anwesenheit des nucleolenartigen Gebildes nnd die besondere Lage des Centrosoms, wie ich sie fand, ergeben eine Differenz. Doch weist die Angabe Brasil's über die Verteilung der Kerne im ganzen Syzygium darauf hin, daß seine Fig. 18 nnd meine Figuren sich auf die gleiche *Monocystis*-Species beziehen dürften.

Die Gameten und ihre Copulation.

Haben die Kernteilungen im Syzygium ihr Ende erreicht nnd ist die Oberfläche der Syzygiten nnn gleichmäßig mit den definitiven

Kernen besetzt, so beginnt ein von Paraglykogenkörperchen freies Plasma sich an der Basis der Kerne anzusammeln und dann die Kerne zu nmfließen. Es entstehen dadurch die bekannten Bilder, wie sie die älteren Arbeiten zeigen. Was die Formveränderungen betrifft, welche die beiden Restkörper vielfach bei der Gametenbildnng zeigen, so wird es genügen, auf die von Bütschli (4) in seine Bearbeitung der *Sporozoa* anfgenommenen Fignren Lieberkühn's (9) hinzuweisen. Während der Prozeß, der zur Gametenbildung führt, von Cuénot und Prowazek richtig erkannt wnrde, gibt Cecconi eine Darstellung, die mit meinen Beobachtungen nicht im Einklang steht. Nach Cecconi nämlich branchen die Gametenkerne gar nicht an die Oberfläche der Syzygiten zu gelangen. Sie sollen vielmehr in Gestalt sehr kleiner, stark färbbarer Granula im Maschenwerk des Cytoplasmas verstreut liegen und sich dann hier mit einer Plasmaportion umgeben. Jedes nrsprüngliche Chromatingranulnm soll sich daranf in vier Chromatinkörner auflösen. Diese Gebilde wandern alsdann an die Peripherie der Syzygiten. Da die geschilderte Entstehung der Gameten im Innern der Syzygiten den Tatsachen vollkommen widerspricht, müssen wohl schlecht konservierte Präparate Cecconi's Täuschnng herbeigeführt haben, wenn nicht höchstwahrscheinlich eine Verwechselung der Gameten mit Kernen vorliegt.

Seit der Entdecknng Siedlecki's, daß bei *Monocystis ascidiae* isogame Produkte copnlieren nnd ihrer Bestätigung dnrch die Befunde Cuénot's nnd Prowazek's bei den Monocystideen des Regenwnrms galt die Isogamie bei allen Monocystideen als feststehend. Diese verallgemeinernde Annahme erlitt erst durch Brasil einen Stoß, der bei *Urospora lagidis* eine Differenzierung der Gameten fand, die hauptsächlich in der verschiedenen Größe und Fügung der Gametenkerne besteht. Brasil glanbte auch in seiner Arbeit über *Urospora* nnd *Gonospora* die Isogamie bei den Monocysteen des Regenwnrms in Frage stellen zu können, allerdings hatte er selbst damals keine Untersuchnngen darüber angestellt. Aus Größenunterschieden, wie sie Fig. 22 und 23 von Cuénot und Fig. 11 nnd 12a von Prowazek ergäben, sei auch bei den Lnmbricusmonocystideen auf eine Verschiedenheit der Gameten zu schließen. Obwohl Brasil inzwischen die Monocystideen von *Lumbricus herculeus* untersucht und da eine Anisogamie beschrieben hat, die den Verhältnissen bei *Urospora* ungemein ähnlich ist, scheint mir die Deutung der Figuren Cuénot's nnd Prowazek's immer noch gewagt, denn bei allen Monocystideen, die in *Lumbricus* vorkommen, sind die Verhältnisse sicher

nicht so, wie sie Brasil gefunden hat. Bei den Fignren Cuénot's und Fig. 12a Prowazek's wird der Unterschied in der Kerngröße, wie aus anderen Abbildungen ersichtlich ist, wohl nur ein zufälliger sein, der vielleicht am Präparat gar nicht vorhanden, sondern durch ungenaue Wiedergabe entstanden ist. Mehr zu bedenken in dieser Hinsicht gibt Prowazek's Fig. 11, die leider nicht glücklich gewählt ist. Prowazek sagt zwar selbst davon in der Tafelerklärung: „Ansbildung von Sporoblasten, die des oberen Individnums sind größer, einzelne des unteren Individuums copulieren.“ Gerade so gut könnten aber die Gameten, die dem oberen Individnum anliegen, schon copuliert sein, die zweikernigen Gameten machen die Copulation sogar wahrscheinlich.

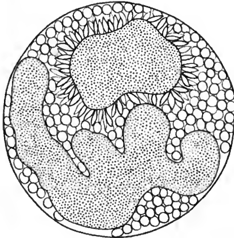
Die Fälle von Anisogamie, wie sie Brasil von einer Regenwurmmonocystidee in seiner Fig. 27 abbildet, lagen auch mir vor. Brasil beschreibt die beiderlei Gameten als birnförmig. Die mit einer feinen Membran versehenen Gametenkerne liegen excentrisch. Jeder Gametenkern ist mit einem Centriol durch einen Attraktionskegel verbunden, der über die Oberfläche des Gameten hinausragt. Der eine Syzygit liefert kleine Gameten mit kleineren „hyperchromatischen“ Kernen. Die Gameten des anderen Tieres sind größer, ebenso ihre Kerne, in denen weniger Chromatin enthalten sein soll. Zu dieser Beschreibung Brasil's kann ich nnr beifügen, daß ich immer am Gametenkern eine Vacuole fand (siehe anch Fig. 34), daß sich dagegen nur in seltenen Fällen an der Spitze des Gameten ein kleines schwarzes Pünktchen mit Eisenhämatoxylin darstellen ließ, welches dem Centriol Brasil's entsprechen könnte.

Brasil gibt an, die Gameten niemals in Bewegnng gesehen zu haben. Aus dieser Notiz geht hervor, daß er versucht hat, die Entwicklung und die Schicksale der Gameten auch im Leben zu verfolgen. Sonst scheint die Untersuchung von lebendem Material von vielen Untersuchern vernachlässigt worden zu sein, obwohl diese Methode für die Beobachtung der gegen Fixiergemische empfindlichen Gameten äußerst wertvoll ist. So gelang es mir dadurch bei einer *Monocystis* eine ganz spezielle Art von sexueller Differenzierung der Gameten aufzufinden, die in 15—20 Fällen an lebenden Syzygien studiert werden konnte.

Die beobachteten Fälle hatten eine große Ähnlichkeit mit den von Léger (7) bei *Stylorhynchus longicollis* beschriebenen Verhältnissen. Ob die von mir aufgefundenen Syzygien eine neue Art repräsentieren, oder ob sie auf eine schon bekannte Form zu beziehen sind, konnte nicht entschieden werden. Da dieselben erst bei der

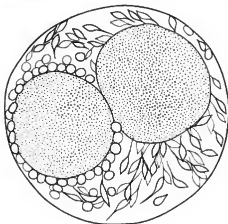
Gametogenese auffallend hervortraten, blieben die dazugehörigen freien Tiere unbekannt. Die Paraglykogenkörper entsprachen der Größe nach denen von *Monocystis lumbrici* Henle (*Monocystis agilis* Stein ist nach Cuénot synonym!). Diese Einschlüsse wiesen manchmal bei den zwei encystierten Individuen einen geringen Größenunterschied auf, ein Erkennungszeichen des Geschlechtes der Syzygiten ließ sich jedoch nicht daraus ableiten.

Die ersten Phasen der Gameteneutwicklung zeigen nichts Auffälliges. Es entstehen zunächst an beiden Tieren rundliche Gameten, die sich ganz ähnlich sehen. Doch bald zeigen die beiderlei Gameten einen bedeutenden Unterschied. Während die des einen Tieres in ihrer Entwicklung gleichsam stehen bleiben, d. h. ihre rundliche Gestalt beibehalten, kommt es zur Bildung länglicher Gameten am anderen Tiere, indem hier die Ausbildung der Gameten fortschreitet. Gewöhnlich nach einer halben Stunde, vom ersten Hervorsprossen aus ihrem Syzygiten gerechnet, spitzen sich die betreffenden Gameten zu und zwar unterziehen sich dieser Veränderung alle Gameten des einen Individuums. Schon bei schwächerer Vergrößerung ist dieser Unterschied frappant zu erkennen (Textfig. 2). In den meisten Fällen war der Syzygit, der die länglichen Gameten lieferte, kleiner als der andere, von dem die rundlichen Gameten stammten. Dieser wies häufig eine immer stärker hervortretende Lappung auf.


Textfig. 2.

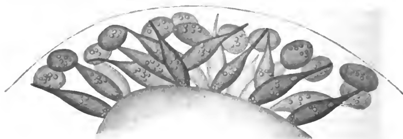
Die in die Länge gezogenen Gameten bekommen einen deutlichen Schnabel (Rostrum Léger's), an dessen Basis der Kern liegt, wie sich bei manchen Gameten erkennen läßt (Textfig. 4 rechts). Lichtbrechende Körnchen finden sich sowohl im Plasma der länglichen als auch der rundlichen Gameten. Bei Beginn der Beobachtung fand ich die rundlichen Gameten (Eier Léger's) immer um ihren Restkörper angeordnet, wie Textfig. 3 noch zeigt. In allen Fällen (z. B. Textfig. 2 u. 4), wo sie sich in der Cyste

zerstreuen und auch zwischen die länglichen Gameten zn liegen kommen, scheint dies lediglich die Wirkung des Deckglasdruckes zu sein, denn wo der Deckglasdruck ansgeschlossen war, behielten sie ihre ursprüngliche Lage bei. Das Volumen der bald kugeligen, bald eiförmigen Gameten des einen Tieres entspricht ungefähr dem der länglichen Gameten, manchmal erschienen die „weiblichen“ sogar kleiner als die „männlichen“ Gameten, wie dies nach Léger's Zeichnungen auch bei *Stylorhynchus longicollis* der Fall sein dürfte. Jedenfalls wäre die Bezeichnung Macro- nnd Microgameten hier unzntreffend.



Textfig. 3.

Die in der Cyste zerstreuten rundlichen Gameten lassen eine zitternde Bewegung wahrnehmen. Ebenso weisen die festsitzenden länglicben Gameten eine geringe Bewegung anf, die sich in einer Verschiebung des Schnabels nach rechts oder links äußert. Die Gestalt der länglichen Gameten, wie sie sich in Textfig. 4 zeigt, ist noch nicht die definitive. Sie schieben sich allmählich nach außen,



Textfig. 4 (1300 ×).

wobei sich der Schnabel wieder etwas zu verkürzen scheint. Während sie vorher mit breiterer Basis am Restkörper festsaßen, wird jetzt zwar noch eine Verbindung mit dem Restkörper beibehalten, allein

das Plasma wird zu einem dünnen Faden ausgezogen. Vorher schon, hauptsächlich aber in diesem Stadinm kann man eine langsame, aber ausgiebige pendelnde Bewegung konstatieren, besonders wenn man zu zeichnen versucht. Darauf reißt offenbar der Plasmastiel an der Ansatzstelle ab, der längliche Gamet wird frei (Textfig. 3 und 5a). Ob dieser Plasmafaden als Geißel funktioniert und wellenförmige Bewegnngen ausführt, wie es Léger von „Spermatozoen“ bei *Stylorhynchus* angibt, kam nicht znr Beobachtnng, ist aber jedenfalls sehr wahrscheinlich.

Leider war es mir unmöglich, eine Copulation zwischen den beschriebenen Gameten eintreten zu sehen. Der Cysteninhalt verfiel immer schon vorher dem Verderben. Besonders deutlich waren die Zeichen der Degeneration an den länglichen Gameten. Am Geißelende traten Anschwellungen anf, die zn bläschenförmigen Plasmaansammlungen führten (Textfig. 5b). Auch wurden längliche Gameten beobachtet, die sich zusammenkrümmten nnd den Abbildnngen 16 u. 17 Léger's glichen, die degenerierende *Stylorhynchus*-Spermatozoen darstellen.



Textfig. 5 (1300 ×).

Meine cytologischen Befunde über den Bau der „männlichen“ Gameten sind sehr mangelhaft. Ich konnte nnr an einer fixierten nnd gefärbten Cyste nachweisen, daß die vorher im lebenden Gameten am Vorderende befindliche hellere Stelle tatsächlich der Kern ist. Außerdem fand ich in Schnittserien von Lnmbricnssamenblasen Bilder, die ich gar nicht auf die im Leben beobachteten Fälle zn beziehen wagen würde, wenn nicht eine gewisse Homologie mit den Verhältnissen bei *Stylorhynchus* vorhanden wäre. In manchen Syzygien, deren Gameten schon gebildet waren, fiel ein Unterschied zwischen den Produkten der zwei Individuen auf, der sich in ähnlicher Weise wie bei der von Brasil beschriebenen Anisogamie äußerte. Der Unterschied bestand nämlich in der Größe der beiderlei Gameten und in der Beschaffenheit und Größe ihrer Kerne. In Fig. 34 kann man diesen Unterschied erkennen. Die kleineren Gameten weisen anch kleinere Kerne auf, die, weil dichter gefügt, einen kompakteren Eindruck machen. Die Kerne sind wie ihre Plasmakörper terminal zugespitzt. Nach innen vom Kern befindet sich in jedem Gameten

eine undeutlich begrenzte Vacuole. Ähnlich gebaut sind die größeren Gameten. Der Kern verläuft nach vorn spitzig und ist entsprechend größer. Das Chromatin nimmt mehr die Peripherie des Kernes ein. An der Spitze des größeren Gameten sah ich häufig, wie auch in Fig. 34, einen unregelmäßig geformten Plasmalappen, der für ein Artefakt gehalten werden muß. Wahrscheinlich stellt er einen an den lebenden Gameten vorhanden gewesenen Schnabel dar, der beim Fixieren zusammengeschrumpft ist. An einigen wenigen Gameten des gleichen Restkörpers (z. B. Fig. 35) war er nämlich noch mehr oder weniger erhalten. Bei mehreren Gameten konnte eine vom Kerne nach hinten verlaufende feine und nur schwach färbbare Linie verfolgt werden, die sich durch Eisenhämatoxylin und auch Hämalaun sichtbar machen ließ (Fig. 35). Da Léger bei den männlichen Gameten von *Stylorhynchus* einen Faden beschrieben hat, der von einem neben dem Kerne liegenden Centrosom ausgeht und zur Geißelachse wird, so kann man die vorliegende feine Linie wohl ebenfalls als Achsenfaden und die großen Gameten als „männliche“ gelten lassen. Wie dieser Achsenfaden entsteht und ob im Schnabel der größeren Gameten ein Gebilde vorhanden ist, das Léger „tigelle“ nennt, gelang nicht zu entscheiden. Die meisten der großen Gameten saßen fest auf ihrem Restkörper, eine Geißel konnte also noch nicht gebildet sein. Vielleicht sind die Geißeln bei der Konservierung auch nicht resistent genug, weil ich in meinen Schnittserien niemals mit Geißeln versehene Gameten fand. Würde also nichts im Wege stehen, die größeren Gameten mit den im Leben beobachteten männlichen Gameten zu identifizieren, so ist es schwieriger, in den kleineren Produkten die im Leben gefundenen weiblichen Gameten sehen zu wollen, da letztere immer annähernd rund sind, wogegen die Gameten der fraglichen Schnittserie ganz ähnlich geformt sind, wie die größeren Produkte. Man müßte höchstens annehmen, daß auch in der Entwicklung der von mir im Leben als rund beobachteten Gameten ein längliches zugespitztes Stadium durchlaufen wird. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß es sich hier um zwei verschiedene Typen von Anisogamie handelt.

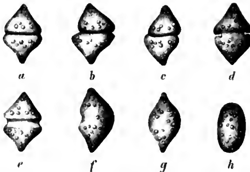
Wie oben erwähnt, kam die Copulation der männlichen und weiblichen Gameten an lebendem Material nie zur Beobachtung. In einzelnen mit Eisenhämatoxylin gefärbten Cysten hingegen kamen mir Zygoten zu Gesicht, die ich, allerdings mit einigem Vorbehalt, als Resultate einer Anisogamie zu deuten geneigt bin (Fig. 36 u. 37). Die Bilder erinnerten sehr an die Fig. 54 und 55 Léger's. Neben dem Kerne war ein verschieden gebogener Faden sichtbar, der als

noch nicht aufgelöster Achsenfaden des männlichen Gameten interpretiert werden könnte.

Hat sich also die Gametenausbildung, wie ich sie in den Textfig. 2—5 abgebildet habe, schon weit von einer Isogamie entfernt, so finden sich bei den Arten, welche die von Brasil beschriebene Anisogamie aufweisen, jedenfalls Übergänge zu einer Isogamie. Brasil sagt selbst: „Le dimorphisme est loin de se manifester avec la même intensité pour tous les Monocystis.“ Besonders bei einer Art, die große Gameten aufweist, sei der Dimorphismus weniger ausgeprägt. Diese Art scheint übrigens schon (1854) Adolf Schmidt (14) in seiner Fig. 11 abgebildet haben. Die Deutung der Figur ist der damaligen Anffassung entsprechend natürlich nicht richtig.

Die bisherigen Beobachter haben die Gametencopnlation bei den Monocystideen von *Lumbricus* nur auf Schnitten konstatiert. Mir selbst gelang es in einem Falle, die Verschmelzung lebender Gameten zu beobachten.

In einer Cyste fand ich sämtliche Gameten zu Paaren vereint, ein Zustand, der kurz vorher eingetreten sein mußte. Die Copula hatte ungefähr die Gestalt zweier sich mit den Grundflächen berührender Kegel, deren Achsen bei manchen Paarlingen seitlich etwas verschoben waren (Textfig. 6a, b, c). Die Berührung war nur in der Mitte der Grundflächen eine innige und hier begann auch



Textfig. 6 (1300 ×).

das Zusammenfließen des Plasmas. Textfig. 6d und e stellt zwei Paare nach dem Zusammenfließen der Protoplasmakörper, das erste im optischen Schnitt, das zweite in Oberflächenansicht dar. Besonders klar erkennt man an dem ersten Bilde, wie die kugel-

förmigen Grundflächen der beiden Gameten an ihrem äußeren Rand noch nnverschmolzen sind, so daß an dem Gesamtkörper eine znnächst ziemlich tiefe gürtelförmige Einschnürnng besteht, die allmählich flacher wird (Fig. e) nnd sich schließlich vollkommen verliert. In Fig. f ist sie anf der rechten Seite schon verschwunden, auf der linken noch sichtbar. Schließlich präsentiert sich als Endresnltat der Copnlation die spindelförmige Zygote (Fig. g). Der geschilderte Vorgang nahm nngefähr drei Stnnden in Ansprnch, bis die meisten Paarlinge verschmolzen waren. Die Copnlae zeigten eine ähnliche Bewegung, wie man sie anch an von ihrem Restkörper losgelösten Gameten sehen kann, nämlich ein leichtes zitterndes Hin- und Herdrehen, worin sich wohl nur ein physikalischer Vorgang ausspricht. Weiter entwickelten sich die Zygoten in dem besprochenen Falle nicht, aber in einer anderen Cyste, die bereits spindelförmige Zygoten enthielt, konnte ich beobachten, daß die der späteren Sporocyste ähnliche Spindelform von der Zygote nicht beibehalten wird. Durch Abrundung der Pole wird sie eiförmig (Textfig. 6h), zur Kngelgestalt, wie Cuénot angibt, geht sie jedoch nach meiner Erfahrung nicht über.

Da die vorgefundenen aneinanderklebenden Gameten keine Größen- nnd Formenverschiedenheiten zeigten, bin ich geneigt, für diesen Fall eine Isogamie anzunehmen, obwohl ich die Größe der Gametenkerne der lebenden Copula nicht feststellen konnte.

An konserviertem Material hatte ich im allgemeinen keine klaren Bilder der Copnla bekommen. Nur einmal fand ich eine Cyste, deren in Copnlation begriffene Gameten annähernd dieselbe Gestalt anfwiesen, wie ich sie im Leben beobachten konnte. Die Fig. 38—42, die diese Verhältnisse zeigen, sind etwas stärker vergrößert als die Textfig. 6, stellen aber jedenfalls den gleichen Vorgang dar, den ich im Leben beobachtet habe. Die Kerne liegen, wie es schon im Leben schien nnd wie ich auf Schnitten bestätigt fand, anfangs in der Nähe der Kegelspitzen der Copnla (Fig. 38) und wandern dann einander entgegen. Die Aneinanderlagernng der birnförmigen Gameten erfolgt also mit der dem Kerne entgegengesetzten Seite. Wie die Figuren zeigen, lassen weder die Gameten, noch ihre Kerne einen deutlichen Größenunterschied erkennen. Aus der ziemlich variierenden Lage des durch Verschmelzung der zwei Gametenkerne entstehenden Zygotenkerns, ergibt sich, daß die Wanderung der beiden Kerne nicht gleichen Schritt zn halten braucht. So finden wir in Fig. 39 den einen Kern bereits am Äqnator angekommen, während der andere noch an der Kegelspitze

liegt. Auch scheint das Zusammentreffen der beiden Kerne meistens nicht in der Achse, sondern stark excentrisch zu erfolgen.

Die Zygote und ihre Umwandlung zur Sporocyste.

Nach der Verschmelzung weist der Zygotenkern einen den Gametenkernen ähnlichen Bau auf. Um den Kern herum zeigt sich eine undeutlich begrenzte Vacuole, von der ich nach dem ganzen Aussehen der Präparate nicht entscheiden möchte, ob sie in der lebenden Zygote vorhanden ist. Cecconi muß wohl die Grenzen dieser Vacuole für seine dünne Membran gehalten haben, die den Zygotenkern umschließen soll. Seine Fig. 13 macht diese Annahme sehr wahrscheinlich. Brasil beschreibt auf diesen Stadien große hyaline Kugeln, die im Kerne wachsen und dann in das Cytoplasma ausgestoßen werden sollen. Ich habe oben schon von Vacuolen in den Gameten gesprochen und möchte hier der Vermutung Ausdruck geben, daß es sich vielleicht in allen diesen Fällen von Brasil und von mir um eine bloße Reagentienwirkung handeln könnte, die sich in einer Schrumpfung des Kernes äußert, bei welcher ein Teil des Kernsaftes in das Cytoplasma austritt.

Eine typische mitotische Reduktion, wie sie Schnitzler (16) an den Gameten von *Gregarina ovata* gefunden hat, wurde seither bei keiner anderen Gregarinenspecies mehr festgestellt. Auch bei den Monocystideen des Regenwurms scheint ein derartiger Vorgang an den Gameten zu fehlen. Über die von mehreren Autoren bei verschiedenen Gregarinen beobachteten Vorgänge an Gametenkernen, die als Kernreduktion oder Kernreinigung aufgefaßt wurden, brauche ich mich nicht weiter zu verbreiten, da Brasil bereits eine eingehende Zusammenstellung der verschiedenen Resultate gibt und auch Schellack, der selbst solche Verhältnisse bei *Echinomera hispida* beschreibt, sich eingehender mit dieser Frage beschäftigt hat. In einigen mit Eisenhämatoxylin überfärbten Präparaten konnte ich im Plasma von Gameten und Zygoten dunkle Substanzen in Form kleiner Körnchen und Fädchen wahrnehmen. Doch die Eisenhämatoxylinfärbung bringt ja alle möglichen Strukturen zur Darstellung und es ist ganz unzulässig hier ohne weiteres einen Schluß auf das Vorliegen von chromatischer Substanz zu ziehen, die etwa vom Kerne ausgestoßen sein könnte. Bei spezifischer Kernfärbung (Hämalaun und Essigkarmin) waren die Körnchen und Fäden nicht zu sehen. Auch für die „gros grains chromatiques“, die Brasil mit großer Regelmäßigkeit in den Zygoten einer *Monocystis* gefunden hat, gilt der gleiche Einwand,

daß sie nur mit Eisenhämatoxylin dargestellt sind nnd also für ihre Chromatinnatur kein Beweis erbracht ist. Brasil ist der Meinung, daß diese Kugeln aus dem Kern ausgestoßen werden, doch läßt sich dafür aus seinen Bildern kein Anhaltspunkt gewinnen, da sie nirgends ein entsprechendes Gebilde noch innerhalb des Kernes erkennen lassen. So bleibt also die Deutung dieser Bildungen, die mir in meinen Präparaten niemals zu Gesicht gekommen sind, einstweilen unsicher. Brasil meint in der von ihm vermuteten Ausstoßung aus dem Kern einen einfachen Ausscheidungsprozeß vor sich zu haben, der mit der Bildung der künftigen Sporocystenhüllen im Zusammenhang steht. Speziell leitet er von den kugeligen Gebilden die schon von Prowazek beschriebenen Verschlußknöpfe am inneren Sporocystenhäutchen ab. Da ich diese Verdichtungsstellen auch in meinen Präparaten finde, ohne daß dieselben von jenen Brasil'schen Kngeln das geringste erkennen lassen, erscheint mir diese Deutung Brasil's sehr wenig wahrscheinlich. An dieser Stelle will ich einen Befund mitteilen, für den ich vorläufig keine Erklärung zn geben vermag, der aber vielleicht in Beziehung mit den von Brasil beschriebenen Beobachtungen steht.

In einer mit Essigkarmin frisch behandelten Cyste, die große Gametencopulae mit meistenteils noch nicht verschmolzenen Kernen und nur noch wenig einzelne Gameten enthielt, fielen kleine Körper auf, die in größerer Anzahl anzutreffen waren und zum Teil an der Innenseite der Cystenmembran lagen (Fig. 43). Die in zwei Größen vorhandenen Plasmakügelchen enthielten in ihrem Innern eine stark mit Karmin gefärbte Substanz. Manche Stadien könnten als Teilungsstadien angesehen werden, aus denen die kleineren Körperchen durch einmalige Teilung hervorgegangen wären. Da mir der Ursprung dieser Gebilde nicht bekannt ist, kann ich den Befund nur erwähnen, ohne weitere Schlüsse daraus zu ziehen. Ob es sich um dieselben Körper handelt, die Brasil in den Zygoten findet und die vielleicht mit einem kleinen Plasmaüberzug aus den Zygoten ausgestoßen werden, da sie Brasil aus denselben plötzlich verschwinden sieht, muß ich dahingestellt sein lassen.

Die Zygote — ob durch Isogamie oder Anisogamie entstanden, ist hier gleichgültig — scheidet eine dünne, anfänglich eng anliegende Membran, die äußere Schalenhaut (épispore) aus, die sich an den Polen abzuheben beginnt. Die Abhebung der Membran braucht nicht an beiden Enden des länglichrunden Gebildes zugleich zu erfolgen, sondern häufig eilt sie an einem Pole voraus. Die Membran verdickt sich nach nnd nach und bildet an den Polen die bekannten

lichtbrechenden Knöpfe. Mit diesen Polknöpfen können sich die Sporocysten, wie es bei anderen Gregarinen der Fall ist, gegenseitig zusammenhängen. Nicht selten sieht man Cysten, in denen Sporocysten bündelweise vereinigt sind, in dem in der Mitte des Bündels ihre Polknöpfe aneinander kleben. Preßt man solche Cysten, so lösen sich die Sporocysten auseinander. Vielfach verbinden sie sich auch außerhalb ihrer Cyste zu rosenkranzförmigen Ketten. In ihrem Innern birgt die Sporocyste die schon in den Gameten vorhandenen Einschlüsse.

An konservierten, mit Eisenhämatoxylin gefärbten jungen Sporocysten fand ich kleine Körperchen, die neben der oben erwähnten, wohl artifiziellen Vacuole lagen. Dieselben unterschieden sich klar von zufällig anwesenden dunkler gefärbten Körnchen. In einem kleinen hellen Bezirke war ein winziges schwarzes Pünktchen deutlich zu sehen (Fig. 44, 45). Solche Gebilde sah ich auch in den früher beschriebenen, als Produkte einer speziellen Anisogamie gedenteten Zygoten. Ich bin geneigt, diese stets nur in der Einzahl vorhandenen Bildungen als Centrosomen oder Centriolen aufzufassen.

Dieser Befund steht nicht vereinzelt da. In den Gameten von *Stylorhynchus* und deren Copula liegen an der Kernmembran ähnliche Centrosomen mit doppelten Centriolen. Prowazek beschrieb in den *Monocystis*-Gameten nicht weit vom Kern eine verdichtete Stelle und in manchen Amphionten zwei Verdichtungsstellen. Diese Verdichtungsstelle hielt er für den letzten Sphärenrest.

Jeder Gamet wird wohl mit einem Centrosom versehen sein. Brasil beschreibt ja auch in jedem Gameten ein „Centriol", das durch einen Attraktionskegel mit dem Gametenkern in Verbindung steht. Nach der Copulation wären also zwei Centrosomen (Centriolen) eine Zeitlang in der Zygote zu finden, was ich jedoch nicht mit vollkommener Sicherheit konstatieren konnte. Ob sich das von mir angetroffene Centrosom (Centriol) der Zygote mit dem Kern durch einen Attraktionskegel in Verbindung setzt und so ein Bild entstehen würde, wie es Brasil in Fig. 37 und 38 gegeben hat, konnte ich nicht beobachten.

Zur Beschreibung der Kernteilung in der Sporocyste habe ich nur wenig hinzuzusetzen. Während Wolters den Vorgang als indirekte Teilung gedeutet hat, hält ihn Cuénot für keine richtige Mitose. Cecconi bildet direkte Teilungen ab. Prowazek dagegen hat die Spindelbildung beschrieben, ebenso findet Brasil mitotische Teilungen. Zu den Angaben Brasil's möchte ich nur eine kurze Bemerkung einzufügen. Brasil faßt die länglichen, hantelförmigen

sich überkreuzenden Sporozoitenkerne, wie sie Prowazek in den Fig. 29 und 30 dargestellt hat, als Chromosomen der ersten, das ganze Sporocystenplasma ausfüllenden Teilnngsspindel auf. Ich glaube hingegen, daß Brasil's Fig. 39 viel besser zwischen seine Fig. 43 nnd 44 zn stellen ist, so daß also die Kerne, für deren Gestalt Prowazek keine rechte Erklärung hatte, als junge Sporozoitenkerne aufzufassen wären, die eben ans den Tochterplatten der vier Spindeln hervorgegangen sind und noch nicht ihre definitive Gestalt angenommen haben. Während in Fig. 19 Prowazek's und Fig. 39 Brasil's je vier Kerne an den beiden Polen der Sporocyste liegen und daher eine Deutung, wie sie Brasil gibt, ermöglichen, konnte ich mich auf eigenen Präparaten überzeugen, daß die länglichen Sporozoitenkerne in der Sporocyste ganz unregelmäßig verteilt sein können und durch ihre Lage beweisen, daß sie nicht als Chromosomen der ersten Teilungsspindel aufzufassen sind.

Riesensporocysten.

Mit diesem Namen will ich diejenigen Sporocysten bezeichnen, die von den typischen spindelförmigen Sporocysten durch ihre Gestalt und Größe unterschieden sind. Auf Schnitten zeigen sie gewöhnlich die Form eines Dreiecks mit drei mehr oder weniger deutlich ansgeprägten Polen. Doch können diese monströsen Formen in der Gestalt auch vielfach variieren. Solche anormale Sporocysten wurden zuerst wohl gleichzeitig (1854) von A. Schmidt (14) und N. Lieberkühn (9) beschrieben. Während ersterer dieselben als Mißbildungen ansieht, glaubt Lieberkühn an eine Verwachsung von zwei oder drei gewöhnlichen Exemplaren. Eine Menge Abbildungen der „spores concrètes“ gibt (1875) Aimé Schneider (15). Er faßt diese Sporocysten als Verklebung von zwei oder mehreren Stücken anf, hält indessen eine unvollständige „individualisation“ während der Teilung (segmentation) für wahrscheinlicher. Unter segmentation wäre hier die „Sporoblasten“-Bildung zn verstehen. Allerdings ist die letztere Erklärung nicht mehr annehmbar, da sich inzwischen gezeigt hat, daß sich die Sporocysten nicht direkt aus den „Sporoblasten“ herleiten, sondern erst durch eine Copnlation von Gameten entstehen. Übrigens glaubt Schneider, daß es sich bei den so zahlreichen Variationen nicht nur um Konkretionen handeln kann, sondern daß hier auch der Polymorphismns in Betracht kommt, d. h. daß die gewöhnlichen Sporocysten als „Microsporen“, die anormalen als „Macrosporen“ aufzufassen seien, eine Ansicht, die inzwischen ebenfalls nnhaltbar geworden ist.

In der Arbeit von Bosanquet (1) findet sich eine „monströse“ Sporocyste abgebildet. In neuerer Zeit hat sich Cecconi (5) mit den spores concrètes Schneider's beschäftigt. Er sieht sie jedoch als zufällig unregelmäßige Formen an, die nur durch Deckung (superposition) von zwei oder mehr Sporocysten entstanden seien. Er will ähnliche Bilder wie Al. Schneider in Schnitten gehabt haben, von denen er sagt: „Diese Figuren lösen sich klar auf, wenn man das Präparat verschieden einstellt.“

Um ein scheinbares Decken mehrerer normaler Sporocysten kann es sich indessen bei den Riesensporocysten nicht handeln. Von einer Anflösung in einzelne gewöhnliche Sporocysten bei verschiedener Einstellung der monströsen Formen ist keine Rede. Auch die Art des Vorkommens beweist, daß nicht zufällige Unregelmäßigkeiten vorliegen, sondern eine bestimmte Entstehungsursache zu suchen ist. Ich fand nämlich die Riesensporocysten — wenn sie überhaupt in den Cysten vorhanden waren, was nicht gerade häufig der Fall zu sein pflegt — fast regelmäßig zu mehreren Exemplaren in derselben Cyste. War ein solches Exemplar in einer Cyste zu sehen, so waren in der Nähe auch andere leicht zu entdecken. Frisch untersucht ließen sie ihre Gestalt am besten erkennen. Gewöhnlich waren drei, manchmal auch vier Pole ausgebildet. Im letzteren Falle lagen die vier Pole nur ganz selten in einer Ebene, meist hatten die vierpoligen Riesensporocysten eine Tetraëdergestalt. Mehrpolige sternförmige Gebilde zeigten einen komplizierteren Bau. Wie die normalen enthielten auch die monströsen Sporocysten im Plasma die kleinen lichtbrechenden Körnchen, zwischen denen sich der Kern deutlich abhob, der sich schon im Leben durch sein größeres Volumen von den Kernen der gewöhnlichen Sporocysten unterschied. Gefärbte Schnitte ergaben den gewöhnlichen Sporocysten analoge Kernstadien (Fig. 46, 47, 48). Die gebildeten Sporozoitenkerne zeigten bei gleicher Größe eine erhöhte Zahl. Dieselbe ließ sich in einigen Fällen feststellen, sie ergab 16 Kerne. Diese Zahl wirft vielleicht ein Licht auf die Entstehungsweise der monströsen Formen. Da eine Verschmelzung zweier Gameten eine normale achtkernige Sporocyste ergibt, kann man hier an eine Verschmelzung von vier Gameten denken, wenn man annehmen will, daß ein Gametenkern vier Sporozoitenkernen entspricht. Da es nach meinen Beobachtungen zur Bildung eines einheitlichen Kernes kommt, so ist nach dem Gesagten anzunehmen, daß zur Bildung der Sporozoitenkerne hier eine Teilung mehr erfolgt. Die zu postulierenden Riesenzygoten kamen mir allerdings nie zu Gesicht. Léger hingegen beschreibt solche „copulae

géantes“ bei *Stylorhynchus*. Zwar wurden diese Riesencopulae bei bei ihrer Entwicklung nicht weit genug verfolgt, um feststellen zu können, ob sich dieselben auch zu Riesensporocysten verwandelt hätten. Doch ergaben diese beobachteten Anfangsstadien, daß die Entwicklung bis zur Kern- und Caryosomenverschmelzung gehen kann. LÉGER fand Riesencopulae mit drei oder vier getrennten Kernen, außerdem solche, in denen die einzelnen Kerne zu einem einzigen großen verschmolzen waren, in welchem die jedem Gametenkerne von *Stylorhynchus* eigentümlichen Caryosomen schließlich auch zur Vereinigung kamen. Diese Gebilde müssen also aus mehreren Gameten entstanden sein. Somit ergänzen sich die Beobachtungen von LÉGER und die meinigen gegenseitig aufs beste.

LÉGER glaubt, die Verschmelzung mehrerer Sexualelemente zu einem Gebilde bei *Stylorhynchus* der Polyspermie bei Metazoeneiern an die Seite stellen zu können. Man dürfe zwar hier nicht von einer Verhinderung des rechtzeitigen Auftretens einer Schutzmembran sprechen, welche das Eindringen weiterer männlicher Elemente ausschließen würde, sondern nur von einem mangelnden physiologischen Ausscheidungsvermögen, so daß ein Gamet nach eingegangener Copulation trotzdem noch eine Anziehungskraft auf andere ausüben könnte. Noch näher vielleicht liegt die Vergleichung mit der von O. ZUR STRASSEN (17) genauer erforschten Bildung von Rieseneiern durch Verschmelzung mehrerer Oocyten bei *Ascaris megalocephala*.

Die Bildung der Sporozoiten.

Die Bildung der Sporozoiten der Regenwurmmonocystideen ist bisher von den meisten Bearbeitern mit ungefähr folgendem Wortlaut beschrieben worden: Nach der Bildung der acht Sporozoitenkerne rücken dieselben in die äquatoriale Region der Sporocysten. das Plasma beginnt sich in acht sichelförmige Körper zu trennen, in deren Mitte je ein Kern zu liegen kommt. Die Sporozoiten sind parallel zur Sporocystenachse wie die Segmente einer Orange orientiert.

Es ist LÜHE's (10) Verdienst, auf die offenbar schematischen Eintragungen der Sporozoiten in die Sporocyste hingewiesen zu haben. Die Umkleidung der Kerne mit einem besonderen Plasma erfolgt, wo sie sich gerade befinden, und zwar so, daß der Sporozoitenkern nicht in die Mitte, sondern an ein Ende der länglichen Plasmakörper zu liegen kommt. Ein solches Bild hat bereits BOSANQUET (1) in seiner Fig. 17 gegeben und meine Präparate stimmen damit im

wesentlichen überein. Die kleinen Sporozoitenkörper stehen mehr oder weniger parallel zur Längsachse der Sporocyste. Auf späteren Stadien ist das Ende, welches den Kern enthält (Hinterende von Bosanquet und Lühe) dem Äquator der Sporocyste genähert. Sonst habe ich über die späteren Stadien nichts hinzuzufügen.

Würzburg, März 1908.

Literaturverzeichnis.

1) Bosanquet: Notes on a Gregarine of the Earthworm (Lumbricus herculeus). Journ. of micr. Science Bd. 36 1894.

2) Brasil: Recherches sur la reproduction des Grégarines monocystidées. Arch. de zool. expér. et gén. Ser. 14 Bd. 3 1905.

3) —: Nouvelles recherches sur la reproduction des Grégarines monocystidées. Arch. de zool. expér. et gén. Ser. 14 Bd. 4 1905.

4) Bütschli: Protozoa. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs 1880—82.

5) Cecconi: De la sporulation de la „Monocystis agilis" Stein. Arch. d'anat. micr. Bd. 5 1902.

6) Cuénot: Recherches sur l'évolution et la conjugaison des Grégarines. Arch. de Biol. Bd. 17 1901.

7) Léger: La reproduction sexuée chez les Stylorhynchus. Arch. f. Protistenk Bd. 3 1904.

8) Léger et Duboscq: La reproduction sexuée chez Pterocephalus. Arch. de zool. expér. et gén. Ser. 4 Bd. 1, Notes et Revue, 1903.

9) Lieberkühn: Evolution des Grégarines. Mém. cour. Acad. roy. de Belgique Bd. 26 1854.

10) Lühe: Bau und Entwicklung der Gregarinen. Arch. f. Protistenk. Bd. 4 1904

11) Prowazek: Zur Entwicklung der Gregarinen. Arch. f. Protistenk. Bd. 1 1902.

12) Siedlecki: Über die geschlechtliche Vermehrung der Monocystis ascidiae R. Lank. Extrait du Bull. de l'Acad. de Sc. de Cracovie 18.9.

13) Schellack: Über die Entwicklung und Fortpflanzung von Echinomera hispida (A. Schn.). Arch f. Protistenk. Bd. 9 1907.

14) Schmidt: Beitrag zur Kenntnis der Gregarinen. Abh. d. Senckenberg. naturf. Ges. Bd. 1 1854.

15) Schneider: Contributions à l'histoire des Grégarines des Invertébrés de Paris et de Roscoff. Arch. de zool. expér. et gén. Bd. 4 18.5.

16) Schnitzler: Über die Fortpflanzung von Gregarina ovata. Arch. f. Protistenk. Bd. 7 1905.

17) zur Strassen: Über die Riesenbildung bei Ascariseiern. Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 7 1898.

18) Wolters: Die Conjugation und Sporenbildung bei Gregarinen. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 37 1891.

Tafelerklärung.

Tafel IX.

Alle Abbildungen sind mit Hilfe des Abbé'schen Zeichenapparates entworfen. Mit Ausnahme der Figuren 22, 47, 48 beträgt die Vergrößerung für sämtliche Bilder 1850 : 1. Die Bilder sind meistenteils nach mit Heidenhain's Eisenhämatoxylin gefärhten Schnittpräparaten gezeichnet.

Fig. 1. Zwei aufeinanderfolgende Schnitte durch einen sich zur Teilung anschickenden Kern einer Monocystidee; *a* zwei Sphären an der Kernmembran, *b* der schwach tingierte Nucleolus.

Fig. 2. Anschnitt eines Kernes, an dessen Membran zwei Sphären liegen, deren Centriolen in Verdopplung begriffen sind.

Fig. 3. Teilungsfigur mit mächtigen Polstrahlungen, Chromosomen nicht sichtbar. Totalpräparat, Boraxkarmin.

Fig. 4—19. Spätere Kerngeneration einer großen *Monocystis*.

Fig. 4—8. Teilung des Polkegels.

Fig. 9. Bipolarer Kern, in den Polkegeln Centriolen.

Fig. 10 12. Vorstadien der Teilung.

Fig. 13—18. Teilungsfiguren.

Fig. 19. Eben gebildete Tochterkerne.

Fig. 20 u. 21. „Somatische" Kerne der gleichen *Monocystis*.

Fig. 22. Teil eines Schnittes durch ein Syzygium der nämlichen Species. Kernteilung fast beendet. 200 : 1.

Fig. 23 33. Kerne und Teilungsfiguren einer anderen großen *Monocystis*. wahrscheinlich *Monocystis herculea*.

Fig. 33. Zwei Tochterkerne, zwischen denen noch Spindelfaserreste sichtbar sind.

Fig. 34. Schnitt durch zwei Syzygiten, an denen verschieden große Gameten gebildet werden.

Fig. 35. Gamet mit Schnabel und Achsenfaden.

Fig. 36 u. 37. Zygoten, in denen ein Faden neben dem Kern sichtbar ist.

Fig. 38—42. Verschiedene Stadien einer Gametencopulation.

Fig. 43. Mit Essigkarmin tingierte Kügelchen aus einer frisch behandelten Cyste mit Zygoten.

Fig. 44 u. 45. Junge Sporocysten mit Centrosomen (Centriolen).

Fig. 46. Riesensporocyste mit einheitlichem Kern. Hämalaun.

Fig. 47 u. 48. Riesensporocysten mit schon gebildeten Sporozoitenkernen. Hämalaun. 1300 : 1.

Über Kernverhältnisse von *Actinosphaerium Eichhorni* bei fortgesetzter Kultur.

Von
Dr. **Maria Boissevain**, De Bilt (Holland).

(Hierzu Tafel X—XIII.)

Im Winter 1906—07 zeigten sich im Zoologischen Institut von München in einer in fortgesetzter Fütterung gehaltenen Kultur von *Actinosphaerium Eichhorni* anfangende Erscheinungen von Degeneration. Auf Anregnng von Prof. Richard Hertwig habe ich, während meines Aufenthaltes daselbst, den Encystierungsprozeß der aus dieser Kultur stammenden Tiere näher studiert. In mehreren Arbeiten hat Hertwig auf die Tatsache hingewiesen, daß während der fortgesetzten Kultur infolge der langdauernden Fnnktion die Zahl der Kerne eines *Actinosphaerium* bedeutend zunimmt. Es war darum wichtig zu untersuchen, inwieweit die Encystiernng hier noch normalerweise vor sich gehen konnte; auch war es von Bedeutung, den Einfluß verschiedener Temperaturen auf den Encystierungsprozeß zu studieren nnd dabei zn prüfen, ob in einigen Fällen eine Art Regulierung des Prozesses infolge der Temperatur stattfindet. Ich hoffte dadurch zugleich die Untersuchungen von Geoffrey Smith über die Größenverhältnisse von Kern und Protoplasma in verschiedener Temperatur näher prüfen zu können. Das Material eignete sich aber weniger zn Messungen, die nnr, wenn an zahlreichen Objekten vorgenommen, ein sicheres Resultat ergeben können; denn wohl infolge der Degeneration, in welcher die zur Encystierung eingesetzten Tiere sich

befanden, encystierte sich im allgemeinen nur ein geringer Prozentsatz derselben, und in der Kälte kam es oft gar nicht dazu. Doch auch bei dem geringen Vergleichsmaterial weisen die Tatsachen alle nach derselben Richtung, und zwar zur Bestätignng von Smith's Beobachtungen, nach welchen sich in der Kälte zahlreiche und kleine Cysten bilden. Außerdem hat meine Kollegin, Miss Doris Mackinnon, die Frage nochmals an normalem Material geprüft. Die Resultate ihrer Arbeit, welche die Ansichten von Smith und von mir bestätigen, wird sie bald selbst veröffentlichen.[1])

Noch ein vierter Punkt kam bei meiner Untersuchung über *Actinosphaerium* in Betracht, nämlich die Frage, ob alle Kerne eines Individuums gleichwertig seien oder nicht. Wenn ein *Actinosphaerium* mit einer großen Anzahl Kerne, die bis über einige Hunderte steigen kann, sich encystiert, so bilden sich daraus ca. 5—20 Primärcysten, je mit einem Kern. Es wurde von Hertwig festgestellt, daß die Kerne der Primärcysten oder kurz gesagt die Geschlechtskerne nicht durch Verschmelznng aus mehreren hervorgehen, sondern daß einfach einzelne vorhandene Kerne anwachsen, während alle übrigen Kerne ± 95 Proz., durch Resorption zugrunde gehen. Wäre hier die Analogie zu den Vorgängen der Conjugation bei den Infusorien durchzuführen, so könnte man die zugrunde gehenden Kerne dem Hauptkern der Infusorieu vergleichen. Der Unterschied zwischen Hauptnnd Nebenkern, bei Infnsorien so dentlich wahrnehmbar, ist anatomisch bei *Actinosphaerium* nicht nachweisbar, wie Hertwig durch zahlreiche Untersnchungen an *Actinosphaerium* bei beginnender Encystierung festgestellt hat. Wichtig wäre es darnm, noch auf andere Weise zn untersuchen, ob hier ein Unterschied vorhanden ist oder nicht. Zn diesem Zweck versuchte ich festzustellen, ob und inwieweit die Temperatur die Zahl der Primärcysten resp. Geschlechtskerne beeinflußt. Schwankt die Zahl bedeutend, d. h. bestimmen die äußeren Bedingungen einigermaßen, ob viel oder wenig Kerne zu Geschlechtskernen anwachsen, so wäre wohl Grund anzunehmen, daß die Kerne anatomisch gleich sind.

Die Kultur, aus welcher ich jedesmal nene Tiere zur Encystierung erhielt, stammte ursprünglich aus einem dem Münchener Institnt so wohl bekannten Weiher in Possenhofen am Starnberger See. Anfang November 1906 wurden einige Tiere von dort ins Institut übergebracht, wo sie dann mit Stentoren stark angefüttert wurden. Es

[1]) Während des Druckes dieser Arbeit wurde Miss Mackinnon's Arbeit bereits veröffentlicht. Sie wurde in der Literaturliste aufgenommen.

zeigten sich dann Perioden von reichlicher Nahrungsaufnahme, abwechselnd mit Perioden, in welchen die Tiere wenig oder sozusagen gar nichts in sich aufnahmen. Diese letzten Perioden, die „Depressionsperioden", waren im Anfang kurz, dauerten später länger und hatten dann oft eine so starke Wirkung, daß viele Tiere zugrunde gingen. Encystierungsversuche in dieser Zeit unternommen blieben ohne Erfolg. Da trat ungefähr Mitte Dezember nach einer längeren Depressionsperiode eine erneute lebhafte Vermehrung ein, jetzt aber mit deutlichen Kennzeichen von Degeneration. Es fingen nämlich viele Tiere an schwarz und fleckig zu werden, das Protoplasma zeigte unregelmäßig angeordnete Vacuolen und bei einigen war es sogar lappig ausgezogen. Auch die Pseudopodien wurden regellos oder verschwanden ganz. Andere Tiere waren bräunlich, was auf eine reichliche Pigmentbildung deutete. Am auffallendsten waren die Tiere mit ausgeprägter Kernvergrößerung, welche am lebenden Tier gut zu beobachten war. Die wenig zahlreichen, aber abnorm großen Kerne waren etwas heller als das umgebende schwärzliche Protoplasma und oft noch von einer dunklen Zone umgeben; auch die Pseudopodienbildung war ärmlich. Um diese Zeit bereiteten sich einzelne Tiere zur Encystierung vor. Sie wurden dann sorgfältig aus der Hauptkultur gehoben und weiter kultiviert. Die Cysten entwickelten sich normal weiter und zeigten auf den Schnitten auch nichts Außerordentliches, nur daß die Kerne etwas hyperchromatisch waren. Es waren vielleicht Tiere, welche zufälligerweise der Depression noch nicht lange ausgesetzt waren. Unterdessen begann es mit der Hauptkultur schlecht zu gehen; wenig fehlte daran und sie wäre nach kurzer Zeit ganz zugrunde gegangen. Einzelne Individuen blieben dennoch am Leben, und nach einigen Tagen begann die Nahrungsaufnahme aufs neue, was eine lebhafte Vermehrung zur Folge hatte.

Als die Hauptkultur Anfang Januar 1907 in dieses Stadium eingetreten war, bekam ich jedesmal von Prof. Hertwig die Tiere zu meinen Encystierungskulturen. Ich tat sie dann in ein Uhrgläschen mit reinem Kulturwasser und ließ sie dort ein oder höchstens zwei Tage verweilen, um ihnen Gelegenheit zu geben, sich von ihren Nahrungsballen zu befreien. War dieser Prozeß vorüber, dann wurden die Tiere wieder in reines Kulturwasser gebracht, jetzt aber auf zwei Uhrgläser verteilt und zwar so, daß sich in jedem Uhrglas eine gleiche Zahl möglichst gleichmäßig großer Tiere befand. Das eine Uhrglas wurde dann in einen Thermostat, welcher einer konstanten Temperatur von 22° C ausgesetzt

war, gestellt, das zweite wurde anfangs in den Korridor, später aber (weil dort die Temperatur einer zu großen Schwankung unterworfen war) auch in ein Thermostat, mit einer konstanten Temperatur von 9° C, gestellt. Solange die Tiere sich noch nicht encystiert hatten, wurden sie jeden Tag in ein reines Uhrglas mit frischem Kulturwasser gebracht, um die Bildung von Pilzen so viel wie möglich zu verhindern. Später aber, nachdem sie sich bei der Vorbereitung zur Encystierung fest angesetzt hatten, war das nicht mehr möglich und konnte nur noch das Kulturwasser mit einer Pipette sorgfältig erneuert werden.

Den Verlauf der Encystierung von *Actinosphaerium Eichhornii* darf ich als bekannt voraussetzen, aber zum leichteren Verständnis der folgenden Anseinandersetzungen werde ich ihn in kurzen Zügen rekapitulieren.

Das freischwimmende *Actinosphaerium* zieht die Pseudopodien ein, setzt sich fest und umgibt sich mit Gallerte. Zu gleicher Zeit findet eine ansehnliche Verringerung der Kernzahl durch Resorption statt. Dieses Stadium heißt Muttercyste. Die Muttercyste zerfällt in so viele Primärcysten, als noch Kerne übrig geblieben sind, und jede Primärcyste teilt sich in zwei Sekundärcysten. Die Kerne der letzteren teilen sich zweimal, wobei jedesmal ein Richtungskörper gebildet wird. Es ist das die „Reifung“ der Sekundärcysten. Hierauf verschmelzen die „reifen“ Sekundärcysten zu Conjugationscysten oder sogenannten Keimkugeln. Diese Vorgänge sind mit einer Lupe am lebenden Material sehr gut zu beobachten.

Bei meinen Versuchen nun sorgte ich sofort, wenn die Encystierung einen Anfang gemacht hatte, für Abtötung der Cysten in allen aufeinanderfolgenden Stadien. Sie wurden dann mit einer Pipette auf ein Objektglas gebracht und in Pikrinessigsäure fixiert. Nachdem die Cysten darin wenigstens eine halbe Stunde verweilt hatten, wurden sie in Alkohol ausgewaschen. Mit Boraxkarmin gefärbt und in Nelkenöl aufgehellt, worin sie als Totopräparat längere Zeit sehr gut aufgehoben werden können. Für die Messungen an den Cysten und den Kernen genügten diese Totopräparate schon. Für die feineren Vorgänge an den Kernen war es jedoch notwendig, Schnittpräparate zu machen.

Wie gesagt, war die Encystierung nicht so allgemein, wie man hätte wünschen mögen. Viele Tiere starben nach mehreren Tagen, durch Verhungerung und Verpilzung, ohne sich encystiert zu haben.

Die folgende Tabelle gibt das Resultat der eingesetzten Kulturen.

	Zahl der Tiere sowohl in der Wärme als in der Kälte	Angesetzt am	Zahl der Cysten in der Wärme	Zahl der Cysten in der Kälte
1.* resp. Kultur Nr. 1	17	15./I.	10	6
2.* „ „ „ 2	25	16./I.	12	0
3.	9	19./I.	0	0
4.	4	20./I.	4	2
5.* „ „ „ 3	30	21./I.	16	4
6.* „ „ „ 4	19	23./I.	19	6
7.* „ „ „ 5	23	26./I.	14	8
8.* „ „ „ 6	22	1./II.	22	0
9.	38	15. II.	12	4
10.* „ „ „ 7	26	22./II.	10	0
11. „ „ „	40	2./III.	0	0

Nur die Kulturen mit * wurden in dieser Arbeit berücksichtigt.

Die Rubrik „Zahl der Cysten in der Kälte“ weist ein besseres Resultat auf, als in Wirklichkeit vorhanden war, weil die meisten Tiere sich nicht viel weiter als bis zum Muttercystenstadium entwickelten.

Von den oben citierten Kulturen konnten einige wegen der geringen Encystierung nicht berücksichtigt werden, während mir bei der technischen Vorbereitung einige schöne Präparate verloren gingen, so daß im ganzen nur sieben Kulturen für nähere Untersuchung zur Verfügung standen: Ich werde sie zuerst, jede für sich, beschreiben.

Kultur Nr. 1. Angesetzt am 15. Januar mit 17 Tieren in der Wärme und ebensovielen in der Kälte.

Die meisten Tiere befanden sich bereits im Muttercystenstadium. Etwas weiter entwickelten sich in der Wärme 10, in der Kälte 3.

	Größe der Primärcysten	Größe der Sekundärcysten
In der Wärme	$80 \times 50\ \mu$	$30 \times 50\ \mu$
In der Kälte	$60 \times 30\ \mu$	$30 \times 30\ \mu$

Wärmekultur. Hier und da sieht man einige nicht resorbierte Kerne zwischen den Einzelcysten liegen. Die Encystierung verläuft bei den meisten gut; die Cysten sehen lebensfähig aus und würden sich zweifellos zu normalen Conjugationscysten entwickelt haben. Nur die Kieselhülle ist überall sehr dick. Bei den später

Abgetöteten ist die Zahl der nicht resorbierten Kerne zwischen den Cysten höher und die Cysten sehen etwas kränklich aus. Die Zahl der Einzelcysten in jedem Cystenkomplex wechselt von 10—15.

Kältekultur. Diese Kultur hatte wenig Erfolg. Von den drei Cysten, welche sich über das Muttercystenstadium hinaus entwickelten, ist eigentlich keine normal zu nennen. Obgleich die Cysten selbst ziemlich gut entwickelt sind, haben die Kerne ein pathologisches Aussehen: sie sind klein, blaß und stark geschrumpft. In den meisten Cysten ist denn auch die typische Bildung von Reservematerial unterblieben. Nur eine Primärcyste hat sich normal in zwei Sekundärcysten geteilt und zeigt dabei die normale Reservestoffbildung. Sie ist 60×30 μ groß, und auffallend ist es, daß gerade diese gesunde Primärcyste kleiner ist als die krankhaften, welche 67×48 μ messen.

Alle anderen Cysten verharrten noch mehrere Tage im Muttercystenstadium und starben dann langsam ab. Dabei trat die merkwürdige Erscheinung zutage, daß die Kerne vorher große Haufen Chromatin auswarfen, jedoch ohne wiederum teilungsfähig zu werden.

Das erste Stadium wurde in Fig. 22 Taf. XIII abgebildet. Das Objekt war zuerst mit Boraxkarmin und später mit Delafield's Hämatoxylin nachgefärbt. Das Protoplasma hat sich noch nicht in Primärcysten gesondert. Auf jedem Schnitt sieht man ungefähr fünf Kerne, welche alle dieselbe Eigentümlichkeit darbieten, daß nämlich das Chromatin in kleinen Partikelchen rings aus dem Kern tritt. Das ausgestoßene Chromatin ist rot geblieben, während der zurückbleibende Rest, auch der schon vacuolisierte Nucleolus, violett gefärbt ist. Ich sehe darin den Beweis, daß dieses Chromatin nicht mehr assimilationsfähig ist und als überflüssiges Material aus dem Kern entfernt wird, um dann später in Pigment umgesetzt zu werden, denn auch in anderen Präparaten, welche mit Delafield's Hämatoxylin gefärbt wurden, blieb das Chromatin der im Absterben begriffenen und abgestorbenen Kerne rot. Noch ein weiteres Stadium in diesem langsamen Prozeß des Absterbens gibt Fig. 24 Taf. XIII. Der Nucleolus besteht fast nur noch aus großen Blasen und das Chromatin liegt als ein breites massives Band um den Kern herum. Auch die Pigmentbildung hat hier stark zugenommen.

Kultur Nr. 2. Angesetzt am 16. Januar mit 25 Tieren sowohl in der Wärme als in der Kälte.

Nur in der Wärme ist es zur Bildung von einigen wenigen Primär- und Sekundärcysten gekommen. Sie haben folgende Größe:

Größe der	
Primärcysten	Sekundärcysten
65 × 62 μ	32 × 56 μ

Einige Muttercysten, am selben Tag wie die vorgerückteren Stadien abgetötet, geben ein interessantes Bild von den nucleären Vorgängen in diesem Stadium. Offenbar wurde die Encystierung durch die zn große Anzahl Kerne stark gehemmt. Man sieht zahlreiche Kerne in dem noch unverteilten Protoplasma beieinander liegen. Sie haben schon eine Größe von ± 15 μ erreicht, während die Kerne nicht encystierter Tiere aus derselben Kultur ± 11 μ groß sind. Als Beweis von vorausgegangener starker Chromatinauswerfung sind große Massen von Pigment vorhanden. Am auffallendsten ist aber, daß hier viele Kerne vollständig in Anflösnng begriffen sind. Man sieht wenigstens viele membranlose Kerne, welche lange pseudopodienähnliche Fortsätze haben und mit dem Protoplasma offenbar verschmolzen sind. Auch sieht man hier und da Kerne miteinander verschmelzen, doch wohl nur im Moment der Auflösung. Alle Stadien der Auflösung eines Kernes in eine Masse, welche von dem Protoplasma fast nicht mehr zu nnterscheiden ist, sind dentlich wahrznnehmen (Fig. 6 Taf. X).

Die anderen Präparate derselben Kultur zeigen alle eine übermäßige Zahl hyperchromatischer Kerne. Charakteristisch für alle, sowohl ans der Wärme als aus der Kälte stammenden Tiere ist die große Häufigkeit von Pigmentkörnchen. Bei einem Objekt, wo mehrere Tiere sich seit einigen Stunden plasmogamisch vereinigt hatten, ist das Protoplasma damit ganz durchsetzt.

Die Vorgänge in dieser Kultur bilden eine Fortsetzung zu denjenigen der ersten. War dort schon ein Übermaß von Kernmaterial zu konstatieren (unresorbierte Kerne in der Wärme und starke Chromidienbildung in der Kälte), so hat es hier noch zngenommen. Auch die Bildung von Chromidien ist hier intensiver vor sich gegangen. Dennoch war die Encystierung gering.

Kultur Nr. 3. Angesetzt am 21. Jannar mit 35 Tieren in der Wärme und ebensovielen im Zimmer. Sie wurden diesmal in ein Zimmer gestellt, weil einige frühere Kulturen (welche hier nicht berücksichtigt sind) sich im Korridor gar nicht encystierten, da die Temperatnr daselbst offenbar zu niedrig war. Die Temperatur im Zimmer schwankte um diese Zeit täglich zwischen 16 und 19° C, was dem Encystierungsprozeß auch nicht günstig sein konnte, so

daß von dieser Zeit an ein Kälte-Thermostat, welcher einer konstanten Temperatur von 9° C ausgesetzt war, benutzt wnrde.

Die Encystierung verlief in der Wärme gut; 16 von den 30 Tieren encystierten sich und die Cysten sahen normal aus. Die Zahl der Einzelcysten schwankte zwischen 4 nnd 25. Nach mehreren Tagen starben einzelne im Muttercystenstadium und es zeigte sich, daß bei diesen die Kernzahl nicht genügend reduziert war.

Dasselbe, aber noch ausgeprägter, war in der Zimmer- resp. Kältekultnr zu konstatieren. Anch hier ein Übermaß an Kernen, zu gleicher Zeit reichliche Pigmentbildung. Nur zwei Cysten entwickelten sich bis zum Primärcystenstadium uud eine von diesen hatte schon einige Sekundärcysten gebildet. Speziell an diesen letzteren ist die Pigmentbildung änßerst reichlich vor sich gegangen, so daß offenbar durch die Auswerfung des überschüssigen Chromatins hier noch die Eucystierung ermöglicht wnrde.

Hier sind die Größeuverhältnisse der Cysten gegeben.

	Größe der		
	Primärcysten	Seknndärcysten	Conjngationscysten
In der Wärme	74 × 56 μ	39 × 50 μ	74 × 55 μ
In der Kälte	55 × 46 μ	28 × 46 μ	

Kultur Nr. 4. Angesetzt am 23. Januar mit 9 Tieren in der Wärme, 19 im Zimmer und 19 im Kälte-Thermostat.

Wärmekultnr. Die 9 Wärmetiere encystierten sich sofort und der Prozeß wickelte sich so schnell ab, daß die Kultur schon am Abend des 24. bis zum Keimkugelstadium vorgeschritten war. Im Zimmer stieg am Nachmittag des 23. die Temperatur über 20° C., weshalb die Zimmerkultur nur noch als Wärmekultnr berücksichtigt werden konnte. Anch hier giug in der höheren Temperatnr die Encystierung gut vor sich. Die Zahl der Einzelcysten wechselte von 2—15. Die Kerne sind sehr chromatinreich, aber in allen Stadien sieht man das Chromatin aus dem Kern in das Protoplasma übertreten. Offenbar war das dem Verlauf der Encystierung sehr günstig, denn alle Tiere encystierten sich und die Conjugationscysten sehen normal ans.

Interessant in dieser Kultur ist das Vorkommen einer tripolaren Caryokinese eines Primärkerns. Sie wnrde in Fig. 11 Taf. XI abgebildet. Die Hyperchromasie mag hier wohl die Ursache für diesen anormalen Teilungsvorgang sein.

Kältekultur. In der Kälte bildeten sich acht Mnttercysten, von denen sich zwei zu etwas kränklichen Primärcysten entwickelten.

Bei diesen sonderte sich das Protoplasma in der Form unregelmäßiger, ungleich großer Lappen, von denen einige langsam starben, ab, während andere nnd zwar meistens kleinere Teilstücke sich mit einer Kieselhülle nmgaben nnd so eine Art Primärcysten bildeten. Diese Cysten waren änßerst klein nnd blieben längere Zeit in diesem Stadium, ohne sich weiter zn teilen — dann starben auch sie.

Hier folgen die Größenverhältnisse:

	Größe der Primärcysten	Sekundärcysten	Conjugationscysten
In der Wärme	74 × 50 μ	37 × 55 μ	70 × 55 μ
In der Kälte	50 × 42 μ		

Die anderen Kältecysten gingen nach mehreren Tagen, ohne Primärcysten gebildet zu haben, zugrunde. Eine solche ist in Fig. 14 Taf. XI abgebildet. Das Stadium ist jung, denn von der Kieselbildung ist noch keine Spnr zu bemerken, aber die großen Vacuolen und die ersten Spuren der Reservestoffbildung nnd auch sonstige Vorgänge, welche anf Encystierung deuten, geben das Recht anzunehmen, daß hier die Encystierung vorbereitet wird. Sofort fällt hier die nngeheure Zahl der änßerst chromatinreichen Kerne anf. Sie beträgt ± 180, was für dieses Stadium, wo die Kernreduktion meistens zu Ende gekommen, anßerordentlich hoch zn nennen ist. Man sieht auch einige Kerne, welche in toto ausgeworfen wurden, an der Peripherie liegen, und anch vieles Kernmaterial wurde in Pigmenthanfen umgewandelt; aber offenbar war die Kernreduktion nicht genügend, um eine Encystiernng zu ermöglichen. Die meisten Kerne fangen denn anch langsam an zu sterben. Der Kerninhalt schrnmpft znsammen und zu gleicher Zeit anch die Membran, welche lange Zeit noch deutlich zu sehen bleibt.

Kultur Nr. 5. Angesetzt am 26. Januar mit 23 Tieren in der Wärme nnd ebensovielen in der Kälte.

W ä r m e k n l t u r. Charakteristisch für die Wärmekultnr ist, daß die Kernreduktion nicht durch allmähliche Resorption, sondern durch Ausstoßung der Kerne in toto zustande gekommen ist. Wahrscheinlich infolge dieser energischen Kernansstoßung ist der Verlauf der Encystierung sehr normal gewesen. Die Zahl der Einzelcysten beträgt 10—14, und die Cysten sind etwas größer als in den bisherigen Wärmekulturen.

	Größe der Primärcysten	Sekundärcysten	Conjugationscysten
In der Wärme	82 × 62 μ	35 × 50 μ	56 × 46 μ
In der Kälte	30 × 33 μ !		

Kältekultur. In der Kälte konnte das überflüssige Kernmaterial nicht so leicht entfernt werden, und einige eigenartige Mißbildungen sind die Folge davon. An der Hand der Fig. 4, 2, 3, 1 u. 5 Taf. X und Fig. 13 Taf. XI, welche verschiedene Stufen in der Entwicklung dieser Kältecysten zeigen, werde ich sie etwas ausführlicher beschreiben. In Fig. 4 Taf. X wurde ein Tier mit übermäßigem Kernmaterial abgebildet. Die Kerne haben normale Größe (15—17 μ), sind aber sehr zahlreich und dabei stark hyperchromatisch. Der Nucleolus ist in mehrere Teilstücke zerfallen. Das rötlich gefärbte Protoplasma enthält viele Chromidien, welche sich an der Peripherie zu Pigment umgewandelt haben. Offenbar machen die Kerne einen energischen Versuch das Chromatin zu entfernen. Diesen Prozeß in weiterem Stadium zeigt Fig. 3 Taf. X. Die Kerne haben ungefähr dieselbe Größe wie in Fig. 4, enthalten aber weniger Chromatin, während die Pigmentbildung in ihrer Umgebung bedeutend zugenommen hat. Der Encystierungsprozeß hat hier eben angefangen. Große Massen Kiesel sind gebildet, und das im Verhältnis zu den Kernen äußerst wenig vorhandene Protoplasma zieht sich in dünnen Strängen von Kern zu Kern. Aber auch die absolute Kernzahl ist sehr hoch. In dieser ziemlich kleinen Muttercyste sind noch ± 40 Kerne vorhanden, denen die Bildung von 40 Primärcysten entspricht. Es ist klar, daß hier das allzu ungünstige Verhältnis von Protoplasma zu Kernmasse eine Abfurchung in Primärcysten fast unmöglich macht. Der Prozeß der Chromatinentfernung schreitet immer weiter und in Fig. 2 Taf. X ist eine Cyste abgebildet, deren Kerne fast gar kein Chromatin enthalten. Diese Kerne sind sehr groß, messen ± 24 μ und sind von ovaler Gestalt. Sie haben eine sehr deutliche Kernmembran. Das Kernreticulum ist locker und enthält nur einige wenige blasse Chromatinpartikelchen. Die Nucleoli sind in toto ausgestoßen; man sieht sie sehr deutlich neben den Kernen im Protoplasma liegen. Neben diesen großen blassen Kernen kann man auch einige kleinere, welche dunkler aussehen und ein dichteres Kernreticulum haben, wahrnehmen. Einige liegen in der Peripherie und sehen aus, als ob sie der Auflösung anheim fallen werden, andere wieder sind schon deutlich darin begriffen, während noch andere so nahe aneinanderliegen, daß sie ohne Zweifel miteinander verschmelzen werden. Mir scheint, daß diese Kerne den sogenannten „hypertrophischen Kernen", von welchen in Hertwig's Arbeit: „Über physiologische Degeneration bei *Actinosphaerium Eichhorni*" mehrfach die Rede ist, entsprechen. Über diese Kerne sagt Hertwig u. a. (S. 329), daß sie häufig oval sind, durch

eine membranartige Verdickung gegen das angrenzende Protoplasma scharf abgesetzt sind und alle Übergänge zwischen einem feinmaschigen und grobmaschigen Kerngerüst aufweisen. Einige sind ganz chromatinfrei geworden und „diese achromatischen Kerne enthalten meist noch einen achromatischen Nucleolus, der im Centrum liegt, noch häufiger aber wandständig ist; andere Kerne bestehen nur aus dem Kerngerüst“ (Hertwig l. c.). Offenbar stellen die von mir geschilderten Kerne eine merkwürdige Phase in der Evolution dieser hypertrophischen Kerne dar. — Ob durch diese Prozesse das Tier endlich noch die Fähigkeit zur weiteren Entwicklung gewinnen wird, kann ich nicht sagen, läßt sich aber wohl vermuten, wenn man sieht, daß in dieser Kultur auch Cysten vorgekommen sind, bei denen die Sonderung in Primärcysten wirklich stattgefunden hat. Eine solche Cyste wurde in Fig. 13 Taf. XI abgebildet. Jedem, dem das normale Cystenbild einigermaßen bekannt ist, wird es sofort auffallen, daß hier eine höchst abnorme Bildung zustande gekommen ist. Die Zahl der Einzelcysten ist bei diesen Cysten sehr hoch. Sie beträgt ± 45, was die normale Zahl fast um das Doppelte übertrifft. Trotz dieser geringen Kernreduktion ist die Encystierung gut zustande gekommen. Die Cysten sind aber außerordentlich klein. Während ihre Kerne eine normale Größe von 18—19 μ haben, messen sie nur 30—33 μ! Hier ist also ein enormes Mißverhältnis zwischen Kern und Protoplasma entstanden. Die Kerne haben nur eine dünne protoplasmatische Hülle und sind von einer dicken Kieselhülle umgeben, so daß eigentlich das Mißverhältnis noch größer ist. Hier und da ist die Abfurchung der Primärcysten etwas mangelhaft vor sich gegangen; man sieht dann zwei und auch mehrere Kerne zusammen in einer Kieselhülle resp. Cyste liegen (Fig. 13 Taf. XI). Leider stehen mir weitere Stadien dieser merkwürdigen „Microcysten“ nicht zur Verfügung. Wohl fand ich in der nächsten Encystierungskultur analoge kleine Cysten, welche sich weiter entwickelten. Sie bildeten sich aber nicht in der Kälte, sondern in der Wärme, und ich werde sie später ausführlich beschreiben.

Fragen wir, was wohl die Ursache der oben erwähnten Anomalie sein mag, so ist es nicht schwierig einzusehen, daß, um sie hervorzurufen, hie zwei Faktoren zusammengewirkt haben. Der erste Faktor war das Auftreten einer infolge der lange fortgesetzten Kultur viel zu großen Anzahl Kerne (Degeneration), der zweite Faktor die niedrige Temperatur, infolgedessen die energische Kernreduktion, welche in der entsprechenden Wärmekultur wohl zustande kam, hier nicht eintreten konnte.

Daß die „Degeneration“ weitaus der wirksamste Faktor bei der Bildnng dieser kleinen Cysten war, leuchtet sofort ein, wenn man sie mit den Cysten anderer Kältekultnren vergleicht. Es ist darum besser, die „Microcysten“ bei der Berechnnng der Durchschnittsgrößen der Kältecysten nicht zu berücksichtigen.. Die anderen Kultnren sind wohl auch nicht „normal“, d. h. die Tiere hatten auch von vornherein ein Übermaß von Kernen, doch wohl nicht in so ausgeprägtem Grade, daß man bei der Bildung der Cysten von einer Anomalie reden kann.

Vergleichen wir die Tabelle anf S. 171, dann sehen wir, daß eben um die Zeit, in welcher diese Kultur der Hauptkultur entnommen wnrde, daselbst ein Vermehrungsoptimum erreicht wnrde. Die nächste Kultur konnte erst 6 Tage später, die darauffolgende erst wieder nach 14 Tagen aufgehoben werden. Es trat allmählich eine Depression ein. Es ist wichtig zu konstatieren, daß das Vermehrungsoptimum koinzidiert mit dem Anftreten einer großen Anzahl Kernen. In der nächsten Kultur wird man die weiteren Stadien studieren können.

Zum Schluß muß ich noch erwähnen, daß in dieser Knltur einzelne Cysten vorkommen, bei denen die Teilnng der Primärkerne in Seknndärkerne zustande gekommen ist. Dabei trat die merkwürdige Erscheinung zutage, daß die Abfurchung der Primärcysten unterblieben war, daß also die Primärkerne, während sie noch in der einheitlichen Muttercyste lagen, sich zu teilen begannen. Sämtliche aus diesen Teilungen hervorgegangenen Tochterkerne liegen deswegen auch in dem einheitlichen Protoplasmakörper, welcher von einer gemeinsamen Kieselhülle umgeben ist. In Fig. 1 n. 5 Taf. X ist solch eine anormale Cyste abgebildet. Die Tochterkerne haben sich zu typischen heteropolen Seknndärkernen ansgebildet und liegen in Gruppen zusammen. Es liegen in einer Grnppe 16, in einer anderen 12, in noch einer anderen 4 heteropole Seknndärkerne beisammen. Im Laufe der Entwicklnng rücken sie näher aneinander, bis endlich das Stadium in Fig. 5 erreicht wird. Interessant ist es, daß die chromatischen Pole eine gewisse Anziehungskraft aufeinander ausgeübt haben, denn sie liegen alle mit diesen Polen einander zugekehrt.

Kultur Nr. 6. Angesetzt am 1. Febrnar mit 22 Tieren in der Wärme nnd 22 in der Kälte. Die Tiere waren etwas größer als diejenigen, welche bisher benntzt werden.

W ä r m e k n l t n r. Am 2. Februar war der erste Encystierungsanfang zu konstatieren und es wnrde dann ein Tier abgetötet. Am 4. hatte sich die ganze Knltur encystiert. Die eine Hälfte wurde dann

sofort, die zweite am nächsten Tage abgetötet. Bei der Encystierung hatten anch diese Tiere wiederum große Massen Kerne in toto ausgeworfen. Diese Cysten unterscheiden sich vom gewöhnlichen Typus auf zweierlei und dazu sehr auffallende Weise. Sie enthalten nämlich äußerst zahlreiche und außerordentlich kleine Cysten. In einer Gruppe war die Zahl der Primärcysten ± 40, in einer anderen zählte ich 30, in noch einer anderen 25 Primärcysten. Ältere Stadien ergaben 44, 60, 70, 80, sogar bis 100 Sekundärcysten, welche also 22, 33, 35, 40 und 50 Primärcysten entsprechen. Diese Zahl ist außerordentlich hoch, wenn man sie vergleicht mit einer normalen Cystengruppe, bei der die Zahl der Primärcysten gewöhnlich nicht mehr als 5—12 beträgt.

Die nächste Tabelle gibt eine Übersicht über die Zahl der Einzelcysten mit den entsprechenden Cysten und Kerngrößen. Sie sind einigen der größten Cystenkomplexe entnommen.

Zahl der Einzelcysten	Cystengröße	Kerngröße
1. Primärcysten		
25	$46 \times 57\ \mu$	$18\frac{1}{2} \times 18\frac{1}{2}\ \mu$
30	$46 \times 37\ \mu$	$18\frac{1}{2} \times 18\frac{1}{2}\ \mu$
40	$40 \times 40\ \mu$	$17 \times 18\ \mu$
2. Sekundärcysten		
27	$37 \times 37\ \mu$	$11 \times 11\ \mu$
60	$37 \times 26\ \mu$	$9\frac{1}{4} \times 11\ \mu$
70	$35 \times 28\ \mu$	$11 \times 11\ \mu$
75	$37 \times 24\ \mu$	$11 \times 12\ \mu$
100	$37 \times 28\ \mu$	$9\frac{1}{4} \times 12\ \mu$
3. Conjugationscysten		
44	$46 \times 50\ \mu$	$13 \times 13\ \mu$
38	$37 \times 46\ \mu$	$13 \times 13\ \mu$

Trotz der übermäßigen Zahl äußerst kleiner Cysten scheint der Encystierungsprozeß leidlich gut fortgeschritten zu sein, wenigstens das Vorkommen einiger sehr lebensfähig aussehender Grnppen von Conjugationscysten läßt das vermuten. Bei näherer Untersuchung ergab sich aber eine Reihe interessanter Abweichungen vom normalen Verlauf, welche gewiß wichtig genng sind, nm hier etwas ausführlicher beschrieben zu werden.

An erster Stelle zeigte es sich, daß die Cysten einer und derselben Grnppe in sehr verschiedenen Stadien der Entwicklung begriffen waren, was bei einer normalen Cystengruppe nicht der Fall zn sein pflegt. So sieht man oft zu gleicher Zeit Primär- nnd Sekundärcysten in einem Cystenkomplex nebeneinander liegen oder

auch Sekundärcysten in allen Stadien der Reifung neben Conjugationscysten. Was aber sodann auffällt, ist das vereinzelte Vorkommen enormer Kerne, sowohl Primär- als Sekundärkerne. Während die meisten Primärkerne eine Größe von 17—18½ μ haben, findet man plötzlich unter ihnen einige mit einer Größe von 23, ja sogar von 26 μ. Wenn man dabei an die außerordentliche Kleinheit der Cysten denkt, wird es klar, daß hier eine große Umänderung des Verhältnisses von Kern und Protoplasmamasse stattgefunden hat. In Fig. 16 Taf. XII u. Fig. 27 Taf. XIII sind zwei solche Primärcysten abgebildet. Die eine hat bei einer Cystengröße von 42 × 40 μ eine Kerngröße von 24 μ. Die andere ist 45 × 37 μ groß und hat einen 25 μ großen Kern. Die Kerne enthalten sehr viel Chromatin, das äußerst fein verteilt im Kernraum liegt, und außerdem kommen noch mehrere größere Nucleoli vor, welche zahlreiche kleine Vacuolen aufweisen. In Fig. 27 Taf. XIII sieht man in der Kieselhülle der Cyste einen großen chromatischen Körper liegen, welcher einem Richtungskörper sehr ähnlich sieht, weshalb ich die Cyste zuerst als eine Sekundärcyste im Stadium der Richtungskörperbildung betrachtete. Die vacuolisierte Beschaffenheit dieses Körpers ließ mich aber vermuten, daß es sich hier um einen ausgestoßenen Nucleolus handele und in dieser Vermutung wurde ich gestützt durch das auch andererseits beobachtete Vorkommen solcher Körper und zwar unter Umständen, wo von Richtungskörpern noch keine Rede sein konnte. So z. B. fand ich einige Sekundärcysten, mit sehr deutlichen heteropolen Kernen, welche auch derartige chromatische Gebilde in der Kieselhülle aufwiesen. Überdies gibt es auch einige Stellen, wo der Nucleolus gerade nahe daran ist in toto ausgestoßen zu werden. Zur besseren Erläuterung dieses Vorganges muß ich die Teilungsprozesse einiger dieser enormen Kerne etwas ausführlicher beschreiben.

Ein sehr günstiges Objekt war mir ein großer Cystenkomplex, welcher aus ± 90 Sekundärcysten bestand und bei dem zahlreiche Kerne in der Teilung begriffen waren. Fast alle waren erste und zweite Richtungscaryokinesen und viele verliefen ganz normal, wie Hertwig es in seiner ersten Abhandlung über *Actinosphaerium* geschildert hat. Bei anderen aber war der normale Verlauf etwas gehindert durch ein Übermaß an chromatischer Substanz. Man sah dann anstatt einer wohldifferenzierten Äquatorialplatte zahlreiche Chromatinpartikelchen über die Spindelfaser verbreitet (Fig. 8 Taf. XI). Bei anderen, wo die Tochterplatten sich bereits gebildet hatten, war das caryokinetische Bild durch das hinzugefügte Chromatin so undeutlich geworden, daß es eher einem in die Länge

gezogenen Kerne glich. Dieser Prozeß führte endlich zu einer Teilung, welche man mit mehr Recht direkt als indirekt nennen dürfte (Fig. 9 u. 10 Taf. XI). Das Chromatin ordnete sich dann nicht mehr zu einer regelmäßigen Äquatorialplatte, sondern klumpte sich in mehrere in die Länge gezogene Stücke zusammen, während der Kern sich in der Mitte einschnürte. Bei einer solchen Teilung sieht man den Nucleolus zwischen den beiden noch nicht ganz abgeschnürten Tochterhälften als eine Art Protuberanz im Protoplasma hervorragen (Fig. 10 Taf. XI). Es unterliegt keinem Zweifel, daß er sich im nächsten Moment losgetrennt hätte und so frei im Protoplasma neben die beiden Tochterkerne zu liegen gekommen wäre. Diesen Zustand kann man auch mehrmals beobachten. Bei der Bildung des ersten Richtungskörpers kann man oft einen zweiten kleinen chromatischen Körper sehen, welcher offenbar nichts anderes als der bei der ersten Richtungscaryokinese ausgestoßene Nucleolus ist (Fig. 7 Taf. X).

Es sei hier bemerkt, daß ein derartiger Vorgang auch von Cuénot, Siedlecki und Léger beobachtet wurde. Léger beschreibt bei *Stylorhynchus* das Vorkommen von zwei Arten Kernen, welche er als somatische und geschlechtliche Kerne unterscheidet. Ich möchte es nicht unterlassen, auf die große Übereinstimmung zwischen Léger's somatischen und den hier oben beschriebenen Kernen hinzuweisen. Sie stimmen zunächst insofern überein, daß beide anormale Größe und Übermaß an chromatischer Substanz aufweisen. Sodann führt bei beiden dieses Übermaß zu einer direkten Kernteilung unter Ausstoßung des Nucleolus. Unmöglich wäre es nicht, daß diese parallelen Vorgänge eine gleiche Ursache haben, und zwar daß die Degeneration des Kernapparates infolge einer langfortgesetzten Kultur diese Prozesse hervorruft.

Was nun die weitere Entwicklung dieser großen Kerne anbetrifft, so findet man in einigen Cysten sehr merkwürdige Vorgänge, welche offenbar durch die enorme Kerngröße veranlaßt sind.

Diese sind:

1. Das Vorkommen von vier anstatt zwei heteropoler Kerne in einer Primärcyste.

2. Das Vorkommen vier gleichwertiger Kerne an der Stelle eines reifen Sekundärkerns und zweier Richtungskörper.

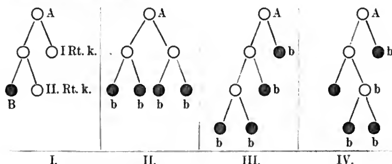
Der erste Fall ist in Fig. 26 Taf. XIII abgebildet. In dem betreffenden Cystenkomplex befanden sich mehrere enorm große Kerne, welche offenbar Primärkerne waren, während andere sich schon in Sekundärkerne geteilt hatten. Die in Fig. 28 Taf. XIII

abgebildete Cyste stellt eine Primärcyste dar, welche sich selbst noch nicht zu Sekundärcysten, deren Kern sich aber wohl schon zu Sekundärkernen geteilt hat. Diese Primärcyste hat einen Durchmesser von 44×48 μ, während die beiden Kerne eine Größe von 12×15 μ haben, also beträchtlich größer sind als ein normaler heteropoler Kern. Auch in anderer Hinsicht weichen sie vom normalen Bau ab, denn ihre Nucleoli sind reich an Chromatin, während sonst für heteropole Kerne echte chromatinfreie Nucleoli charakteristisch sind, wie Hertwig nachgewiesen hat. In demselben Cystenkomplex befand sich nun eine Cyste, welche vier heteropole Kerne enthielt. Der erste Schnitt traf eine Cystenhälfte mit drei Kernen, und auf dem nächsten Schnitt sah man die zugehörige Hälfte mit dem vierten Kern. Die sich ergänzenden Cystenhälften sind in Fig. 26 Taf. XIII abgebildet. Cyste und Kerne sind 44×44 μ und 12×13 μ groß. Letztere sind immer noch reich an chromatischer Substanz. Wie aber sind die vier Kerne in einer Cyste entstanden? Die Möglichkeit wäre gegeben, daß es sich hier um einen ähnlichen Fall wie den unter Kultur Nr. 5 erwähnten handelt. Dort war die Abfurchung in Primärcysten unterblieben und infolgedessen wurde das gesamte Kernmaterial von einer gemeinsamen Hülle umgeben. Da hier aber sonst nirgends etwas von einer mangelhaften Abfurchung zu bemerken ist, ist es unwahrscheinlich, daß hier mehrere (in dem gegebenen Fall also zwei) Primärkerne in einer Cyste vorhanden waren. Eine bessere Erklärung ergibt sich unter der Annahme, daß die Kerne durch fortgesetzte Teilung eines Primärkerns hervorgegangen sind, ein Vorgang, wozu die abnorme Größe dieser Kerne beigetragen hätte. Wie und wann sich der zweite Teilungsprozeß abspielt, konnte ich leider nicht feststellen. Es wäre interessant, zu wissen, ob die Kerne in dem Moment, wo sie sich zur zweiten Teilung vorzubereiten anfangen, schon heteropol waren oder nicht, d. h. ob sie bereits das in Fig. 28 Taf. XIII abgebildete Stadium durchlaufen haben oder ob die zweite Teilung weiter zurückliegt, nämlich noch vor der Ausbildung der Heteropolie. In letzterem Fall könnte man sich vorstellen, daß die zweite Teilung so schnell auf die erste folgte, daß man sie mit dem pathologischen Fall einer vierpoligen Teilung vergleichen könnte, wie doch auch schon in Kultur Nr. 4 eine dreipolige Primärcaryokinese nachgewiesen wurde. Der Grund für diese fortgesetzte Teilung liegt offenbar in der Kombination der abnorm *großen Kerne* mit den abnorm *kleinen Cysten*.

Der zweite Fall, nämlich das Vorkommen vier gleichwertiger Kerne an der Stelle eines reifen Sekundärkernes mit zwei Richtungs-

körpern, beruht auf demselben Prinzip. Auch hier ist eine enorme sowohl relative als auch absolute Größe der Kerne zu konstatieren. Mehrmals fand ich dann — ein Fall, den anch Hertwig erwähnt hat — daß der erste Richtungskörper in relativ spätem Stadium die retrograde Entwicklnng einschlägt. Der zweite Richtungskörper entsteht, während der erste noch als ein deutlicher Kern im Plasma liegt. Er bildet sich relativ noch später zurück, in manchen Fällen sogar findet die Rückbildung gar nicht mehr statt (Fig. 18 Taf. XII). Als letztes Stadinm in diesem Prozeß findet man dann in einer Seknndärcyste vier gleichgroße Kerne, welche alle aus dem einen Sekundärkern hervorgegangen sind (Fig. 19 Taf. XII n. Fig. 23 Taf. XIII). Diese können sich sogar mit einer Kieselhülle nmgeben und es liegen dann im Rahmen einer Seknndärcyste vier extrem kleinere Cysten (8 μ!) (Fig. 7 Taf. X).

Anch hier konnte ich leider nicht genau verfolgen, wie sich diese Teilnngen des Sekundärkerns abspielten. Die Möglichkeit ist gar nicht ausgeschlossen, daß der Sekundärkern sich in zwei Tochterkerne teilt, von welchen ein jeder sich dann wieder teilt. In diesem Fall hätte der dem ersten Richtungskörper entsprechende Kern die Teilfähigkeit gewonnen (Schema II). Andere Bilder, wie Fig. 18 Taf. XII scheinen aber daranf hinzudenten, daß es der geschlechtskern selber ist, welcher sich znm dritten Male teilt (Schema III). Auch wäre die dritte Möglichkeit gegeben, daß nämlich der dem zweiten Richtnngskörper entsprechende Kern sich teilte (Schema IV). Die unten folgenden Schemata verdeutlichen diese drei Möglichkeiten. In Schema I ist die normale Richtungskörperbildung bei einem *Actinosphaerium* dargestellt.



A = der Sekundärkern.
B = der reife Seknndärkern.
b b b b = die gleichwertigen Teilnngsprodukte.

Auf diese interessanten Vorgänge hat Richard Hertwig zum erstenmal hingewiesen. Im Zusammenhang mit seiner Kernplasmatheorie hat er in mehreren Publikationen theoretische Betrachtungen daran geknüpft, welche ich hier kurz wiedergeben werde. Nach der Kernplasmatheorie besteht für jede Zelle ein bestimmtes Größenverhältnis von Kernmasse zu Protoplasmamasse. Bald nach der Kernteilung beginnt das Protoplasma zu wachsen und wächst dann im Verhältnis zum Kern so viel schneller, daß ein Mißverhältnis zwischen Kern- und Zellgröße eintritt, es ist dann die Kernplasmaspannung entstanden. Durch diese gewinnt der Kern die Fähigkeit auf Kosten des Protoplasmas zu wachsen (Teilungswachstum) und dieses starke Wachstum leitet dann zur Teilung. In bezug auf die Kernplasmarelation herrscht nun beim reifen Ei und beim reifen Spermatozoon ein sehr großer Unterschied. Sie enthalten beide gleich viel Kernsubstanz, das Ei aber ist enorm reich an Zellsubstanz, das Spermatozoon äußerst arm, mit anderen Worten die Kernplasmarelation ist in den beiden reifen Sexualzellen in entgegengesetztem Sinn abgeändert.

Die oben beschriebene Umformung der *Actinosphaerium*-Cysten in kleinere Cysten mit größeren Kernen faßt Hertwig nun auf als eine Umformung in der Richtung männlicher Differenzierung. Auch er fand bei der Reifung der Sekundärcysten einige Abänderungen nach dem Typus der Spermatozoenreife. Einige Sekundärcysten nämlich teilten sich, anstatt einen Richtungskörper zu bilden, in zwei gleichwertige Stücke. Es bildete sich also anstatt des ersten Richtungskörpers eine kleine gleichwertige Cyste. Die zweite Richtungskörperbildung unterblieb offenbar, so daß der Verlauf in dieser Hinsicht mehr der Entwicklung parthenogenetischer Eier zu vergleichen wäre. Während also die von Hertwig geschilderten Vorgänge die Mitte halten zwischen der Reifung der Spermatozoen und der Entwicklung parthenogenetischer Eier können die Vorgänge, von welchen in dieser Arbeit die Rede ist, besser noch mit der Spermatozoenreifung verglichen werden.

Kältekultur. Während sich in der Wärme am 4. Februar schon alle Tiere encystiert hatten, zeigte sich damals in der Kälte noch keine Spur davon. Dagegen fingen die Individuen an sich plasmolytisch zu vereinigen, so daß von den 22 Tieren später nur noch wenige gesonderte Tiere vorhanden waren. Die Pseudopodien wurden sehr kurz und die Vacuolen bekamen allmählich ein schmutziges Aussehen. Bei einzelnen war das Protoplasma in unregelmäßige Lappen gezogen und von einer Zone dunkelbrauner Pigmentkörnchen umgeben. Auf den Schnitten zeigten sich die

Kerne in allen Stadien eines langsamen Absterbens begriffen. Einige Tiere sahen, trotz zahlreicher hyperchromatischer Kerne, noch leidlich gesund aus, andere waren partiell, noch andere ganz abgestorben.

In den noch ziemlich gesund aussehenden Tieren haben die Kerne einen Durchmesser von 16—17 μ. Sie sind äußerst zahlreich, von unregelmäßiger Gestalt und ohne Membran. Bei einem Tier, das etwas früher abgetötet wurde, ist aber die Kernmembran deutlich wahrnehmbar. Unter den membranlosen Kernen findet man auch einzelne, welche in Auflösung begriffen sind. Es schwindet hier allmählich der Unterschied zwischen Kernreticulum und Protoplasma. Einzelne Bilder legen die Vermutung nahe, daß hier und da einige Kerne miteinander verschmelzen, doch ist mir kein Fall vorgekommen, wo nicht einige Zweifel daran zurückblieben. Alle Kerne sind stark hyperchromatisch. Das Chromatin ist meist in zahlreiche kleine Bruchstücke verteilt und hier und da etwas vacuolisiert. Öfters auch durchzieht es als ein wurmartig sich schlängelnder Körper den Kernraum. Ein weiteres Stadium zeigt das Chromatin in dichten Ballen zusammengeklumpt (Pycnose). Auffallend ist, daß in dem abgestorbenen Material die Kerne stark zerstückelt sind. In dem ganz abgestorbenen Material ist oft ein Centrum mit großen pycnotischen Kernen, umgeben von einer Rinde parzellierter Kerne (Fig. 12 Taf. XII). Man erkennt darin deutlich die kleinen vacuolisierten Nucleoli, aber auch die Kerne selbst scheinen in kleine Kugeln zerfallen zu sein, genau als ob eine Kernfragmentierung stattgefunden hätte. Hier und da ist das Protoplasma stark rot gefärbt, was auf die Anwesenheit äußerst fein verteilter Chromatinpartikelchen (Chromidien) deutet, als Beweis der letzten Anstrengungen der Kerne, sich von dem überflüssigen Chromatin zu befreien.

Aus den obigen Ausführungen geht hervor, daß diese Kultur in vielerlei Hinsichten von den übrigen Kulturen abweicht. Es wurden im Vergleich zu letzteren in der Wärme sehr viel mehr und sehr viel kleinere Cysten gebildet, während in der Kälte gar keine Encystierung eintrat.

Folgende Tabelle gibt die mittlere Größe der Wärme- und Kältecysten aller übrigen Kulturen im Vergleich zu denjenigen aus dieser Kultur.

Mittlere Cystengröße aller Kulturen, ausgenommen Kultur 5 u. 6

	Primärcysten	Sekundärcysten
In der Wärme	73 × 55 μ	35 × 51 μ
In der Kälte	44 × 52 μ	28 × 40 μ
Cystengröße der 6. Kultur		
In der Wärme	44 × 44 μ	37 × 27 μ

Man sieht, daß die Wärmecysten der 6. Kultur kleiner sind als die Kältecysten der übrigen Knlturen. (Diagramm Fig. 20 Taf. XII.) Man muß annehmen, daß hier die lang fortgesetzte Kultnr die Kernplasmarelation in gleicher oder in noch stärkerer Weise abgeändert hat, als das sonst dnrch die Kälteeinwirkung geschah. Ich halte es für wahrscheinlich, daß die enorme Anzahl Kerne, welche schon in Kultur Nr. 5 anfgetreten war, hier noch eine Zunahme erfahren hat. Ich werde darum diese Wärmekultur ans dem Vergleich mit den anderen Wärmekulturen ausscheiden, weil offenbar die Wärmeeinwirkung nicht kräftig genug war, um den Einfluß der fortgesetzten Kultur (Übermaß an Kernmaterial) zu neutralisieren. Ich komme später noch darauf zurück.

Kultur Nr. 7. Angesetzt am 22. Februar mit 20 Tieren in der Wärme, 20 Tieren im Zimmer und 40 Tieren in der Kälte.

Die Kältekultur starb nach mehreren Tagen, ohne sich encystiert zu haben. In der Wärme und im Zimmer war die Encystierung ziemlich allgemein. Leider trat in der Wärmekultur schon am ersten Tag eine starke Verpilzung ein, infolgedessen die meisten Tiere zugrunde gingen. Im Zimmer war der Verlauf der Encystierung besser. Sowohl im Zimmer als in der Kälte wurden große Massen Kerne in toto ausgestoßen, so daß die, die Cysten umgebende Gallertschicht ganz mit Kernen anfgefüllt erschien.

	Größe der		
	Primärcysten	Sekundärcysten	Conjugationscysten
In der Wärme	63 × 48 μ	35 × 48 μ	55 × 55 μ
Im Zimmer	55 × 48 μ		

Die zurückbleibenden Kerne, welche zu Primärkernen wnrden, zeigten überall ein großes Übermaß an chromatischer Substanz. Primär-, Sekundär- und sogar Conjugationskerne waren alle von Chromatinpartikelchen umgeben, welche offenbar aus den Kernen selbst herrührten und sich auf verschiedene Weise im Protoplasma anordneten. Bald sah man einen gleichmäßigen Kranz kleiner Partikelchen, welche nach allen Seiten ausstrahlten, bald größere Brocken, welche sich dicht an die Kernmembran anschmiegten. Bei einer Cyste veranlaßte dieses protoplasmatische Chromatin eine eigentümliche Bildung. Als sich nämlich der Kern znr ersten Richtungscaryokinese vorbereitete, sammelte sich das ausgeworfene Chromatin an den beiden Polen. Bei der darauf eintretenden Teilung bildete es sich dann zu einer Platte aus, welche genau so anssah, wie die beiden Tochterplatten innerhalb des Kernes. Als ich zum

erstenmal den Vorgang an der noch ungeschnittenen Cyste beobachtete, sah ich drei wohldifferenzierte Tochterplatten, deren Entstehung mir aber unverständlich war. Die Sache wurde erst aufgeklärt, nachdem das Präparat geschnitten war. Offenbar hatte sich bei der Teilung das extranucleare Chromatin genau so wie das intranucleare angeordnet, und eine Platte wohl differenzierter, den Chromosomen sehr ähnlich sehender Chromatinpartikelchen gebildet. Auch am anderen Pol zerfiel das protoplasmatische Chromatin in kleinere Brocken; doch war von einer Anordnung zu einer Platte nichts zu bemerken.

Diese Bildung ist interessant, weil sie etwas beitragen kann zu der Frage nach der Beurteilung der Kräfte, welche bei der Teilung eine Rolle spielen. Die Ortsveränderungen der Chromosomen und sogar ihre Bildung geschieht hier unabhängig von den Spindelfasern und scheint in diesem Fall vom Centrosoma oder von der dem Centrosoma entsprechenden Kraft stark beeinflußt zu werden.

In dieselbe Kategorie fallen nach meiner Meinung die Beobachtungen von Kostanecki an Riesenzellen, von Henneguy am Forellenei und von O. und R. Hertwig an Eiern von *Strongylocentrotus*, unter dem Einfluß äußerer Reagentien. In allen diesen Fällen ist der Einfluß des Centrosoma auf die Ortsveränderungen der Chromosomen auffallend. Etwas Ähnliches wurde auch von Schaudinn bei *Acanthocystis aculeata* wahrgenommen. Nach ihm enthält der excentrisch gelegene Kern einen unregelmäßig bandförmigen oder auch verästelten Nucleolus, welcher unter den Einfluß der Centralkornstrahlung in zahlreiche, zum Centralkorn radiär gerichtete Spitzen ausgezogen wird.

Wie in vielen anderen Fällen ist auch hier die Degeneration des Kernapparates wohl Ursache der oben erwähnten Abnormität.

Aus den oben geschilderten Encystierungskulturen ergab sich als kurz zusammengefaßtes Resultat, daß in der Wärme die Encystierung erstens früher eintrat als in der Kälte, zweitens einen besseren Verlauf hatte. Während in der Wärme der größte Prozentsatz der Tiere sich encystierte, brachten es in der Kälte nur wenige dazu, die meisten starben im Muttercystenstadium ab.

Bei den ersten Kulturen war die Encystierung in der Wärme ziemlich allgemein, es konnte aber ein Übermaß von Kernmaterial konstatiert werden. In der Kälte wirkte dieses Übermaß hemmend auf die Encystierung. Bei den darauffolgenden Kulturen war die Fähigkeit zur Encystierung etwas herabgesetzt und viele Tiere,

sowohl in der Wärme als in der Kälte, starben an dem zu großen Kernmaterial.

Dann folgten zwei Kulturen, bei welchen offenbar die Kernzahl noch stark zugenommen hatte. Merkwürdigerweise gelang hier die Encystierung ziemlich gut. Die Cysten hatten aber ein abnormes Vorkommen.

Die letzte Kultur wurde nach einer kurzen Depressionsperiode angesetzt. Die Encystierung war gering, verlief aber normal.

Um die Größenverhältnisse der Cysten in verschiedener Temperatur kennen zu lernen, vergleiche man die Tabelle auf S. 185. Aus dem wenigen Cystenmaterial, das sich bildete, geht dennoch hervor, daß sich in der Kälte kleinere Cysten als in der Wärme bildeten (Diagramm Fig. 21 Taf. XIII). Auch sind mehrere Andeutungen vorhanden, welche darauf hinweisen, daß die Zahl der Einzelcysten in der Kälte erheblich höher ist als in der Wärme.

Da ich noch feststellen wollte, ob die Cysten meiner aus fortgesetzter Kultur stammenden Wärmekulturen kleiner waren als die aus normaler Kultur stammenden Cysten, zog ich Fräulein Mackinnon's Material, das sie mir freundlichst zur Verfügung stellte, mit in Vergleich. Der Größenunterschied, wenn auch nicht sehr bedeutend, ist doch groß genug, um hier erwähnt zu werden. Es wird auch hierdurch die parallele Wirkung der Kälte und der fortgesetzten Kultur bei *Actinosphaerium* deutlich hervorgehoben.

Die Kerngröße.

Bei der Beschreibung der Kulturen habe ich nur die Cystengröße erwähnt, weil ich deutlichkeitshalber die Kerngrößen gesondert besprechen wollte.

Die Bestimmung der Kerngrößen ist mit größeren Schwierigkeiten verbunden als die der Cystengröße, weil die Kerne gerade während der Encystierung die verschiedensten Wachstumsperioden durchlaufen. Besonders die Sekundärkerne in den verschiedenen Reifungsstadien sind von wechselnder Größe, aber auch die Primärkerne erfahren noch kurz vor der Primärcaryokinese ein erhebliches Wachstum. Bei dem wenigen Material war es mir nicht möglich, die Größen aller dieser Stadien zu bestimmen und ich habe mich deshalb darauf beschränkt, die mittlere Größe eines bestimmten Stadiums zu geben und zwar für den Primärkern, das Stadium

kurz vor der Primärcaryokinese, für den Sekundärkern das Stadium der Heteropolie.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über das erhaltene Resultat.

Kerngrößen freilebender und encystierter Actinosphärien:

	Kerne der Freilebenden	Primärkerne	Sekundärkerne
1. Kultur W.	15 × 15 μ	18½ × 20¼ μ	11 × 14 μ
K.	15 × 15 μ	18½ × 18½ μ	9 × 14 μ
2. Kultur W.	13 × 13 μ	18½ × 18½ μ	9 × 11 μ
K.	13 × 13 μ	—	—
3. Kultur W.	13 × 13 μ	18½ × 18½ μ	12 × 14 μ
K.	13 × 13 μ	18½ × 18½ μ	15 × 14 μ
4. Kultur W.	15 × 15 μ	18½ × 18½ μ	13 × 13 μ
K.	15 × 15 μ	—	—
5. Kultur W.	15 × 15 μ	23 × 18½ μ	11 × 13 μ
K.	15 × 15 μ	18½ × 18½ μ	9 × 12 μ
6. Kultur W.	16¾ × 16¾ μ	{18½ × 18½ μ (26 × 26 μ)}	11 × 11 μ (15 × 13 μ)
K.	16¾ × 16¾ μ	—	—
7. Kultur W.	16¾ × 16¾ μ	18½ × 18½ μ	13 × 13 μ
K.	16¾ × 16¾ μ	18½ × 18½ μ	—

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Kerne der freilebenden Actinosphärien allmählich an Größe zugenommen haben, daß aber (wenn man vorläufig einige Ausnahmen von Kultur Nr. 6, welche zwischen Klammern gesetzt sind, außer Betracht läßt) die Primärkerne keinen erheblichen Einfluß durch diese Größenzunahme erfahren haben. Nur in Kultur Nr. 5 ließ sich in der Wärme eine Größenzunahme der Primärkerne feststellen. Hier waren aber auch die Cysten erheblich größer als in den anderen Kulturen, so daß ungefähr dasselbe Verhältnis von Protoplasma und Kernmasse beibehalten blieb.

Sodann stellte es sich heraus, daß im Gegensatz zu den Ergebnissen, welche wir an den Cysten feststellen konnten, im allgemeinen kein Unterschied der Kerngröße in der Wärme und der Kälte eintrat. Während sich also *in der Kälte kleinere Cysten mit gleichgroßen Kernen wie in der Wärme* bildeten, kann man sagen, daß die Kernplasmarelation zugunsten des Kernes abgeändert wurde, weil die Kerne relativ an Größe zugenommen haben. Zu demselben Resultat ist auch Geoffrey Smith gekommen. Er

hob dabei hervor, daß in der Kälte die Kerne auch relativ mehr Chromatin enthalten.

Was sich aber im allgemeinen, in bezug auf die Kerngröße für die Kulturen feststellen ließ, war nicht zutreffend für die Kultur Nr. 6. Wie schon mehrmals hervorgehoben, hatten die Kerne aus dieser Kultur einen Durchmesser von 26×26 μ, während in Kultur Nr. 5, wo im Vergleich zu den übrigen Kulturen eine Maximalgröße erreicht wurde, die Kerngröße nur 23×18½ μ betrug. In letzterer Kultur konnte darum konstatiert werden, daß eine absolute Kernvergrößerung stattgefunden hatte.

Zusammenfassung.

Wir haben gesehen, daß die Encystierung in der Wärme besser als in der Kälte verlief. Die Tiere, welche sich unter Kälteeinwirkung nicht mehr encystierten, erhielten diese Fähigkeit in der Wärme. Offenbar waren die Tiere nicht imstande, ihr überflüssiges Kernmaterial aufzulösen oder auszuscheiden und durch die zu große Kernzahl wurde dann die normale Entwicklung gehemmt. Einerseits sieht man nun in der Kälte Tiere mit Anhäufungen zahlreicher Kerne, langsam zugrunde gehen, andererseits sieht man einen Anfang von Cystenbildung auftreten. Dazwischen findet man sehr viele Übergänge.

So kommt es vor, daß große, viele Kerne enthaltende Teile des *Actinosphaerium* absterben; infolgedessen scheint dem überbleibenden Teil eine etwas längere Lebensfähigkeit gesichert zu sein (Sequesterbildung).

Oder es bilden die Kerne Chromidien, welche sich dann später in Pigment umwandeln; es wird dadurch viel überflüssiges Kernmaterial entfernt (Chromidienbildung).

Drittens kann der durch die Kälte stark gehemmte Kernauflösungsprozeß bis in die Muttercyste fortdauern und dort noch eine verspätete Kernreduktion verursachen.

Viertens wurde auch Kernverschmelzung einige Male konstatiert.

Alle die hier kurz erwähnten Prozesse können in allerlei Kombinationen und alle zu gleicher Zeit auftreten.

Hat das Tier diese Prozesse gut überstanden, dann sind offenbar die Encystierungsbedingungen etwas gesteigert und es folgt in manchen Fällen die Bildung der Cysten, wenn auch oft sehr mangelhaft, infolge der noch immer viel zu großen Anzahl Kerne. Die Encystierung, welche dann zustande kommt, umfaßt alle nicht

resorbierten Kerne, d. h. jeder nicht resorbierte Kern wird zu einem Primärkern. Infolgedessen erfolgt eine Abfurchung in zahlreiche Primärcysten, welchen relativ nur wenig Protoplasmamasse zukommen kann.

Absichtlich verweilte ich etwas länger bei den Vorgängen, welche unter dem Einfluß der Kälte auftraten, weil im gewissen Grade genau dieselben Prozesse sich in den Wärmekulturen abspielten.

Wie gleich im Anfang dieser Arbeit hervorgehoben wurde, war die Stammkultur, aus welcher unsere Encystierungskulturen abgezweigt wnrden, durch lang fortgesetzte Fütternng in Depression geraten. Die intimeren Kernverhältnisse der aus der Hauptkultnr stammenden, freilebenden Tiere zu beurteilen, bin ich nicht imstande, aber ohne Zweifel hatte, infolge der langdauernden Funktion, die Kernzahl bedeutend zngenommen. Es existierte also von vornherein, sowohl in der Kälte als in der Wärme ein Übermaß an Kernmaterial, daß nun bei der Encystiernng nnter der verschiedenen Einwirkung der Kälte und der Wärme in verschiedenem Grade reduziert wurde. Es stellte sich heraus, daß nnter Einwirkung der Wärme die Kernrednktion besser zustande kam. Mehrmals wurde sogar eine energische Kernausstoßung beobachtet. Dennoch blieb die Zahl der unresorbierten Kerne auch hier noch zu hoch und demzufolge bildeten sich zahlreichere und kleinere Cysten, als unter normalen Bedingungen. Die Kernplasmarelation war also in beiden Parallelkulturen abgeändert und zwar in der Kälte infolge der langdauernden Funktion *und* der Kälteeinwirkung, in der Wärme nur durch *erstere*.

Es treten dadurch ganz ähnliche Erscheinungen bei der Encystierung in der Wärme wie in der Kälte auf.

So erklärt sich auch die Tatsache, daß wir in den Parallelkulturen von Nr. 5 und Nr. 6 einer Reihe Erscheinungen begegnen, welche stufenweise ineinander übergehen, anfangend in der Wärmekultur Nr. 5, sich fortsetzend in der parallelen Kälteknltur und endend in der Wärmekultur Nr. 6.

In der am 26. Januar ausgesetzten Kultur Nr. 5 konnte man feststellen, daß der Verlauf der Encystierung in der Wärme infolge der energischen Kernreduktion (durch Ausstoßung) sehr gut war. Die anfangs abgeänderte Kernplasmarelation wurde durch die Wärme normalisiert. Das ist die erste Stufe.

Die zweite Stufe trat in derselben Kultur in der Kälte ein. Das überflüssige Kernmaterial konnte hier nicht verarbeitet werden, und wirkte hemmend auf die Encystierung. Bei den wenigen Cysten, die sich bildeten, stieg die Zahl der Primärcysten zu ungekannter

Höhe. Diese selbst waren fast nnglanblich klein, während die Kerngröße normal war. Die Kernplasmarelation war hier zugunsten des Kernes abgeändert.

Ungefähr eine Woche später wnrde die nächste Kultur angesetzt. Hier war in der Kälte keine Encystierung mehr möglich: es starben die Tiere an einer zu großen Kernzahl. Offenbar hatten sich in den freilebenden Actinosphärien die Kerne erheblich vermehrt. In der Wärme aber konnten noch große Haufen von Kernen entfernt werden und es kam trotz des Übermaßes an Kernen zu Encystierung. Diese Cysten sahen den Kältecysten der vorhergehenden Kultur sehr ähnlich; die Zahl der Primärcysten war nämlich gleich groß, und auch der Unterschied der Cystengröße gering.

Die Kerne aber waren erheblich größer als diejenigen der großen Cysten anderer Kulturen.

Es wurde hier also die dritte Stufe erreicht, indem die Kernplasmarelation in noch höherem Maße zngunsten des Kernes abgeändert wurde.

Zuletzt sei noch darauf hingewiesen, daß die unter den beiden oben erwähnten Einflüssen auftretende abnorm hohe Zahl der Primärcysten eine Stütze ist für die Behauptung, daß alle Kerne eines *Actinosphaerium* (gewisse Bedingungen vorausgesetzt), imstande sind, sich zu Primärkernen, d. h. Geschlechtskernen nmzubilden.

Es ist mir ein Bedürfnis, an dieser Stelle Herrn Prof. Richard Hertwig für die Gastfreundschaft, die er mir auf dem Zoologischen Institut zu München bewiesen, und für seinen anregenden Unterricht während meines Aufenthaltes daselbst großen Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1901 Cuénot, L.: Recherches sur l'évolution et la conjugaison des Grégarines. Arch. de Biol. Tome XVII.

1892 v. Kostanecki: Über Kernteilnng bei Riesenzellen nach Beobachtungen aus der embryonalen Säugetierleber. Anat. Hefte 1892.

1891 Henneguy: Nouvelles recherches sur la division cellulaire indirecte. Journ. de l'Anat. Bd. XXVII 1897.

1904 Léger, L.: La reproduction sexuée chez les Stylorhynchus. Arch. f. Protistenk. Bd. III.

1887 Hertwig, O. u. R.: Über den Befruchtnngs- und Teilungsvorgang des tierischen Eies unter dem Einfluß äußerer Agentien. Jena 1887.

1898 HERTWIG, R.: Über Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium Eichhorni. München 1898.
1904 —: Über physiologische Degeneration bei Actinosphaerium Eichhorni. Mit 4 Tafeln. Jena 1904.
1905 —: Über das Problem der sexuellen Differenzierung. Verh. deutsch. Zool. Gesellsch. 1905.
1896 SCHAUDINN, F.: Über das Centralkorn der Heliozoen, ein Beitrag zur Centrosomenfrage. Verh. deutsch. Zool. Gesellsch. 1896.
1899 SIEDLECKI: Über die geschlechtliche Vermehrung der Monocystis ascidiae (R. LANK.). Bull. intern. de l'Acad. des Sciences de Cracovie.
1902—03 SMITH-GEOFFREY: Actinosphaerium Eichhorni. A biometrical study in the mass relations of nucleus and cytoplasm. Biometrika Vol. II Cambridge.
1908 MACKINNON, DORIS L.: A few observations on the Encystation of Actinosphaerium Eichhorni. Quart. Journ. of Microscop. Sc. Vol. 52 Part. 3.

Tafelerklärung.

Für alle Figuren geltend:

K = Kiesel.	Nu = Nucleolus.
P = Primärkern.	Vac = Vacuole.
S = Sekundärkern.	Pi = Pigment.

Tafel X.

Fig. 1. Anormale Kältecyste aus Kultur Nr. 5; die Abfurchung in Einzelcysten ist unterblieben, dennoch haben die Kerne sich in Sekundärkerne geteilt.

Fig. 2. Muttercyste mit hypertrophischen Kernen. Nu = Nucleolus, Pi = Pigment.

Fig. 3. Muttercyste mit zahlreichen Kernen und Pigmentbildung. Pi = Pigment, g = hypertrophischer Kern.

Fig. 4. Ein freilebendes Tier, kurz vor der Encystierung, mit zahlreichen hyperchromatischen Kernen (x). Pi = Pigment.

Fig. 5. Eine ähnliche Cyste wie in Fig. 1, etwas stärker vergrößert.

Fig. 6. Muttercyste mit in Auflösung begriffenen Kernen (a u. b). Pi = Pigment.

Fig. 7. Eine Sekundärcyste aus Kultur Nr. 6. B = reifer Sekundärkern, I Rtk = erster Richtungskörper, II Rtk = kernähnlicher zweiter Richtungskörper, Nu = Nucleolus.

Tafel XI.

Fig. 8—10. Abnorme Kernteilungen aus Kultur Nr. 6. Nu = Nucleolus.

Fig. 11. Eine tripolare Primärcaryokinese. (Kultur Nr. 4.)

Fig. 12. Pycnotische Kerne (Py) mit einer Rinde ausgestoßener, zum Teil parzellierter Kerne (z).

Fig. 13. Cyste aus der Kältekultur Nr. 5. a u. b = mehrkernige Cysten.

Fig. 14. Ein im Absterben begriffenes Tier, kurz vor der Encystierung.

Tafel XII.

Fig. 15. Cyste aus der Wärmekultur Nr. 6. *a* = in toto ausgestoßener Kern.

Fig. 16. Eine Primärcyste aus Kultur Nr. 6.

Fig. 17. Eine Sekundärcyste mit kernähnlichen Richtungskörpern. *B* = der reife Sekundärkern.

Fig. 18. Eine Sekundärcyste mit kernähnlichem zweiten Richtungskörper. *B* = reifer Sekundärkern, I *Rtk* = erster Richtungskörper, II *Rtk* = zweiter Richtungskörper.

Fig. 19. Eine Sekundärcyste mit gleichwertigen Kernen.

Fig. 20. Diagramm zur Veranschaulichung der Größeverhältnisse zwischen leidlich normalen Wärmecysten (schwarz) und solchen, welche den Folgen der fortgesetzten Funktion unterworfen waren (rot). (Kultur Nr. 6.)

Fig. 21. Diagramm zur Veranschaulichung der Größeverhältnisse der Kälte- und der Wärmecysten. rot = Kältecyste, schwarz = Wärmecyste.

Tafel XIII.

Fig. 22. Kern mit Strahlenkranz von Chromidien. *Nu* = Nucleolus, *Chr* = Chromidien, *Re* = Reservematerial.

Fig. 23. Eine Sekundärcyste mit 4 gleichwertigen Kernen.

Fig. 24. Ähnlicher Kern wie in Fig. 22. *Chr* = Chromidien, *Re* = Reservematerial, *Nu* = Nucleolus, *Pi* = Pigment.

Fig. 25. Eine anormale Richtungscaryokinese. Das extranucleare Chromatin hat sich an dem einen Pol zu einer Äquatorialplatte angeordnet (*P. chr.*).

Fig. 26. Eine Primärcyste mit vier heteropolen Kernen.

Fig. 27. Eine Primärcyste mit extra großem Primärkern und ausgeworfenem Nucleolus.

Fig. 28. Eine Primärcyste mit zwei extra großen Sekundärkernen.

Opalina.

Its Anatomy and Reproduction, with a Description of Infection Experiments and a Chronological Review of the Literature.

By

Maynard M. Metcalf, Ph. D.
Professor of Zoology, Oberlin O., U. S. A.
From the Zoological Institute, Würzburg.

(With Plate XIV—XXVIII and 17 Textfigures.)

Table of contents.

Acknowledgements.

The work upon which this paper is based has been done in the Zoological Institute in Würzburg. Professor Boveri directed my attention to the favorable character of *Opalina caudata* for cytological study, and suggested also that it would be interesting to compare the reproductive processes in this binucleated species with the phenomena of reproduction which Neresheimer had then recently described for *O. ranarum* and *O. dimidiata*, both multinucleated forms. I cannot adequately express my thanks to Professor Boveri for these suggestions and for the constant advice he has given during the course of the work. I am especially indebted to him for suggestions in regard to the comparative cytological part of this paper.

Professor Spemann kindly shared with me larvae of *Rana esculenta* which he had reared for experimental study. To Dr. Lo Bianco and the Director of the Zoological Station in Naples I am much indebted for material preserved and sent me. Dr. J. Wilhelmi gave me material of *Gunda segmentata* infected with *Hoplitophrya uncinata* which I desired to compare with its reputed relative *Opalina*. He also most kindly lent me many of his series of sections of this Turbellarian, that I might study the parasites. Dr. F. Balzer preserved material of *Opalina* for me during two months in the early spring when I was away from Würzburg, and, during my absence in the summer, Mr. E. Schneidt did me a similar service. Mr. W. B. von Baehr kindly lent me a fine preparation of sections of *O. ranarum* in the rectum of a tadpole of *Rana temporaria*, the only preparation I have had showing zygotes of this species. To all of these, who have so greatly helped me in obtaining material for study, I wish to express my most hearty thanks.

I desire to thank Geheimrath Prof. Dr. F. E. Schulze, and especially Dr. Max Hartmann for assistance in obtaining numerous books. I also wish to thank most cordially the authorities of the Smithsonian Institution, through whose kindness I was enabled to spend two months at the Zoological Station in Naples. During this time I did but little upon *Opalina*, but had the opportunity to study *Hoplitophrya*, which I was very glad to compare with *Opalina*. It is a pleasure to express my appreciation of the assistance and many courtesies received from the Director and Staff of the Zoological Station.

In the spring of 1900 Mr. Ernst Teichmann, at Prof. Boveri's suggestion, began a study of the cytology and reproduction of *Opalina caudata*. The study, however, was never completed. Most of his preparations are mislaid and cannot be found, but I have had the use of one series of his sections, and more recently Prof. Boveri obtained from Mr. Teichmann his drawings and lent them to me. I found in these drawings interesting observations most of which my study had already confirmed, but, as Mr. Teichmann's results were never published, I cannot well refer to them, since, in attempting to do so, I would be in danger of falsely interpreting his drawings.

Material and methods.

In my study of the cytology of *Opalina* I have used chiefly the binucleated species *O. intestinalis* and *O. caudata*, both of which are found in the recta of *Bombinator pachypus* and *B. igneus*. The nuclei in these species are much larger and more satisfactory for study than are those of the multinucleated species. *Opalina intestinalis* is especially good, its nuclei being a little larger than those of *O. caudata*. I have also studied *O. ranarum*, *O. obtrigona*, *O. dimidiata* and *O. zelleri*, using all the methods that were applied to the binucleated species.

For the study of the processes of reproduction I have used *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. dimidiata*, that is — two binucleated and one multinucleated species.

Infection experiments were made with the cysts of these three Opalinas.

The study of the living animals has given valuable results, confirming almost in detail results obtained from the study of

preserved material. These parasitic animals do not live long outside the host. In water they live usually abont one day; in water containing some of the rectal contents and part of the rectum of the host they may live two or three times as long. In 0.6 % Sodium chloride solution they live generally about two days. If part of the rectum of the host and a little of the rectal contents be added to the salt solution the animals live longer, from three to nine days. LOCKE's fluid [1]) semes about as favorable a medium as physiological salt solntion.[2]) *Opalina obtrigona* lived longest in my cultnres. *Opalina caudata* seemed generally the most delicate, thongh I have several times kept it seven days. Occasionally I have had all the animals in a culture die in less than a day, some change in the rectal contents donbtless occurring which poisoned the *Opalinae*. Often some individnals in a culture will live after many others have died. Generally, for a day or two before the *Opalinae* in a culture die, they will show gradually slower and slower movements. Abnormal nnclear conditions are found in these dying animals, as will be described in the chapter on abnormalities.

It is interesting to note that keeping the animals ontside tbe host tends to cause division, perhaps through the nnfavorable environmental conditions.

Large watch-glasses were nsed to contain the cultures of adult *Opalinae*, these glasses bring covered to prevent evaporation. Attempts to rear isolated adults in microscopic aquaria (hollow-ground slides) were not made; snch attempts with the gametes and zygotes were unsuccessful. These are more delicate than the large forms, so that very likely the latter could be kept alive a couple of days or so in snch microscopic aquaria.

For the study of living gametes and other minute forms from the tadpoles. slide cnltures were used. The intestine of the tadpole would be placed upon a slide with a drop or two of 0.6 % NaCl

[1])

Calcium chloride (anhydrous)	0.07 %
Potassium chloride	0.01 %
Sodium chloride	0.06 %
Sodium hicarbouate	0.01—0.03 %.

From Journ. of the Bostou Soc. of Med. Sc. 1896.

[2]) PÜTTER (1905) says that the hest culture medinm for *Opalina* is made of

sodium chloride 0.8 %	100 parts
sodinm and potassium tartrate 30 %. . . .	5 „
distilled water	400 „

and that in this fluid, *when it contains no free oxygen*, *Opalina*, if fed, will live three weeks. I have not tried this fluid, uor used auy oxygen-free culture media.

solution, or Locke's fluid, and be opened under a Zeiss binocular dissecting microscope (magnification fifty diameters) and rapid observation be made of the forms found, all especially interesting phenomena bring noted. This preliminary survey is important for comparison with later appearances which may be suspected of being abnormal. The intestinal wall and contents would then be separated from the *Opalinae* by pushing the former to one side with dissecting needles. The *Opalinae* would then be covered with a thin cover-glass and, after a few moments waiting to allow the edges to dry, the culture would be sealed with Cheeseborough Manufacturing Company's white vaseline. Wax is not a satisfactory sealing for slide cultures which are to be studied with an immersion lens, as pressure upon the cover-glass tends to cause leaks in the wax sealing. These slide cultures live sometimes as much as two days, but often die within eight to twelve hours. Similar slide cultures were often used for studying the adult *Opalinae*, the cover being supported by a couple of very fine hairs. The slide cultures of adult *Opalinae* may live three days, though more die the first or second day.

For studying the finer structure of living *Opalina* the binucleated species are, as already said, by far the better, but not all individuals, even of *O. intestinalis*, are equally clear. Sometimes one finds nuclei in which while alive one can observe with remarkable clearness the chromosomes, the spindle fibres, and the achromatic granules. It is certain that the structures described in the dividing nuclei are not artifacts, for they have been observed not only in preserved material, but in the living animal as well. Probably no one really gives much weight to the sweeping objections that have been made to cytological studies as dealing largely with artifacts, yet many reagents do undoubtedly produce artifacts which are likely to be misleading; it is therefore a satisfaction to be confident that one is describing natural structures and not things that have been produced by manipulation.

Not only does one find many living individuals which do not show their nuclear structure clearly; occasionally one is even unable to distinguish the nuclei at all. One must usually carefully observe a good many individuals before finding one in which the nuclear structures are very clearly seen. It is interesting to note that the posterior nucleus is often clearer than the anterior. At first I thought this was due to the fact that the protoplasm of the anterior end of the body is more dense than that of the rest of the body, but there is a further and even more important reason for this

difference in clearness in the two nuclei. In individuals in which the system of excretory vacuoles[1]) is well developed, one sees that tbese vacuoles usnally lie close along one side of the posterior nucleus (Fig. 1, Pl. XIV, 248, Pl. XXVI). They may extend also alongside of the anterior nucleus, though this is less usual. When such a vacuole is large and lies above the nucleus under observation, one is likely to see the nuclear structures very clearly. If, as sometimes occurs, the system of vacuoles divides, sending also a branch along the opposite side of the posterior nuclens, one has his best opportunity to observe this nucleus, if only the animal is so oriented that one vacuole lies above and the other below the nucleus. In this case the refractive bodies in the cytoplasm (to be discribed later) lie so far above or below the focal plane of the objective of the microscope that they distort the image but little. It is therefore well to search for the most favorable individuals before settling down to careful study of the nucleus. The anterior part of the excretory organ is seldom well seen iu the liviug animal. It is chiefly throngh the study of stained preparations that one reaches tbis explanation of the remarkable clearness of some living nuclei.

In studying the reproductive processes in the spring, it is often valuable first to use living animals and later to treat the same animals with acetic acid or acetic carmine. For example, one can thus allow copnlation to proceed to a particular point, and can then confirm his observations of nuclear and other phenomena in the living animals by studying the same animals treated with one of these reagents. It is often well in such cases to use first acetic acid and, after study, to follow with acetic carmine. Some structures, the nucleolus for example, show far better with acetic acid than with acetic carmine. Often the whole structure of cytoplasm and nuclens comes out with remarkable clearness with acetic acid.

Acetic carmine used upon fresh material is very satisfactory for the study of the outlines of the excretory organs and is invaluable in tbe stndy of the minnte forms in the spring, for, while it is not a sharply definitive stain and while its results, even in the same slide, are often very uneven, yet it is so simple in its application and so prompt in giving its results, that with it one can examine a very great amount of material, and this is essential to the proper understanding of the reproductive processes.

Intra vitam staining with all the usual dyes was tried npon all

[1]) Metcalf, 1907 *b* and *c*.

the species at my disposal execpt *O. zelleri*. The results will be given in the proper connections. They are also shown in a table in the appendix.

For fixing I used chiefly Schaudinn's alcoholic-corosive-sublimate, corosive-sublimate-acetic acid, picro-acetic acid, Flemming's fluid, formol, and absolute alcohol. Of these corosive-snblimate-acetic acid (20 minutes to 36 hours) gave the best results and in the later work was chiefly used.

For staining *in toto* I used principally Grenacher's borax carmine, Mayer's paracarmine, Mayer's haemalum, and Delafield's haematoxylin. Paracarmine did not give very good results. Borax carmine gives a good general stain, bnt does not show the finest details with sufficient clearness. If a thin sheet of green gelatine be placed on the table of the microscope beneath the slide, the definition of detail is much improved,[1]) but even then the borax carmine preparations are not the best. No satisfactory stains were obtained with Mayer's haemalum, except for protoplasmic structure. Delafield's haematoxylin far outclasses all the other stains used for total objets. It is best to stain as darkly as possible (12 to 24 hours in $^1/_3$ strength, $^1/_2$ strength, or even full strength stain) and then to decolorize with exceedingly dilute hydrochloric acid. The decolorization should be watched under the microscope and when it has reached the right point it can at once be stopped by adding a drop of weak ammonium hydrate. The decolorization should be carried to a point that seems extreme, for the objects become much darker upon adding the ammonia. A little experience enables one to regulate the stain very accurately. If upon adding the ammonia the objects are found to be too dark, most of the liquid can be drawn off and acid again added, the decolorization being carried to the desired point. It should, however, be noted that, upon adding acid after ammonia has been used, the decolorization is much more rapid than before the objects were treated with ammonia. With this stain nsed in this way preparations of total objects can be obtained which rival for clearness the best sections.

The animals when stained were run throngh graded alcohols to cedar oil and were mounted in balsam. As Delafield's haematoxylin is exceedingly sensitive to the presence of the least acid, readily fading when in balsam, if this be in the least degree acid, it is

---

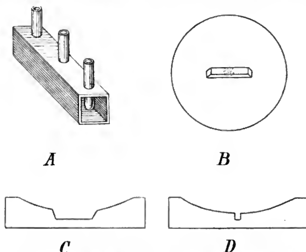
[1]) For suggesting this method, which is a very useful one, I am indebted to Mr. W. Freytag of Würzburg.

well before covering to hold the slide, with the animals in cedar oil upon it, upside down for a few moments over the top of an ammonium hydrate bottle, and to do the same with the balsam on the cover-glass. My preparations so treated have not faded in ten months except near the edges of the cover-glass. Apparently the carbon dioxide of the atmosphere causes decolorization of the objects near the edge of the cover-glass. The objects can be kept from running out from the center toward the edge of the cover-glass by the simple but effective device of placing the balsam before covering in a complete circle just inside the outer edge of the cover.

For sectioning single individuals in predetermined planes YATSU's (1904) *Ulva* leaf method was used. For imbedding large numbers of animals together I used either BOVERI's method of wrapping the animals in a bit of the sloughed skin of a large amphibian (*Cryptobranchus*), or a method which combines suggestions from LEFEVRE (1903) and from PAUL MAYER (1907). In the latter method the animals are carried up to absolute alcohol in ordinary embryo glasses. After dehydration all but a few drops of the alcohol is drawn off. Then with a fine pipette the remaining alcohol, with the animals, is removed and placed in a small gelatine capsule (20 mm by 5 mm) which is set upright in a hole in a pasteboard box (Text Fig. I, *A*). The ends of the box should be removed so that one can look through and see the objects in the bottom of the capsule. After the animals have settled to the bottom of the capsule, the supernatant alcohol is drawn off and xylol added. It is well to change the xylol once or twice to remove all trace of alcohol. After sufficient time, the xylol is removed, melted paraffin in added, and the capsule is set into the warm chamber. The paraffin must be changed to remove all xylol. With care this may be done with a warm pipette, but I find it much easier to effect the change in another way. After the animals have become well infiltrated with the paraffin, the capsule may be removed from its supporting box and its contained paraffin cooled by placing the capsule in cold water. After a few minutes the gelatine capsule will be softened and swollen by the water and the cylinder of paraffin can be easily removed. A second capsule should then be nearly filled with melted paraffin and the tip of the cooled paraffin cylinder, with the contained objects, be cut off and placed in the top of the capsule of melted paraffin and the capsule placed in the warm chamber. As the paraffin cylinder tip melts, the objects sink through the whole length of the capsule, losing *en route* whatever xylol they may

still have had. This capsule may now be taken out of the warm chamber and its contents be cooled in water as before.

A paraffin cylinder with rounded tip is not easy to cut. This difficulty can readily be avoided by using a Lefevre watch glass for reimbedding (Text Fig. I, *C* and *D*). The tip of the cylinder, containing all the objects, is cut off and is placed in the *center* of the groove of an unwarmed Lefevre watch-glass, which has previously been lightly smeared with glycerine. With a hot pipette, melted paraffin in added on each side of the cool paraffin block, care being taken to leave this block with its contained objects still in the center of the groove. The watch-glass is now placed in the warm chamber until all is melted. It is then removed, without jarring, and placed in water, or alcohol (Lefevre), to cool. The resulting block of paraffin is of a shape convenient for sectioning (Text Fig. I, *B*).



Text Fig. I. Illustrating the method of imbedding small objects. *A*, a box containing three gelatine capsules; *B*, the block of paraffin taken from a Lefevre watch-glass; *C* and *D*, sections of a Lefevre watch glass. (*B*, *C* and *D* from Mayer after Lefevre.)

Since the objects to be sectioned are all in the center of the projecting ridge, the ends of the ridge may be cut away and a compact series of sections be obtained. This method is not tedious. It requires no watching. [1])

[1]) I am greatly indebted to Professor Paul Mayer for suggesting the use of gelatine capsules in imbedding. His further suggestion that they might well

To obtain sections of the gametes, whole recta of infected tadpoles were cut. The dirt in the rectnm usually prevents cutting sections thinner than 3, 4, or 5 *micra*, bnt these suffice.

Sections were stained with DELAFIELD's haematoxylin, HEIDENHAIN's iron-haematoxylin, GRENACHER's borax carmine, safranin, safranin and light green (*Lichtgrün*), thionin, gentian violet, methyl violet, methylen blue, methyl green, eosin, dahlia, orange G, fuchsin, magenta, *Kernschwarz*, BIONDI-EHRLICH-HEIDENHAIN's mixture, EHRLICH's triacid mixture and EHRLICH's indulin-aurantia-eosin mixture. All gave results of some value and the comparison of the results obtained from different stains was important, especially in studying the refractive spherules. DELAFIELD's haematoxylin and HEIDENHAIN's iron-haematoxylin were the most generally useful stains. The most differential stain was obtained with safranin and light green (safranin 12 to 24 honrs, light green in 95 % alcohol $^1/_2$ to $^3/_4$ of a minute). The results with all of the stains used are shown in a table in the appendix.

For illumination the light from a Welsbach gas mantel was used, daylight not being strong enough.

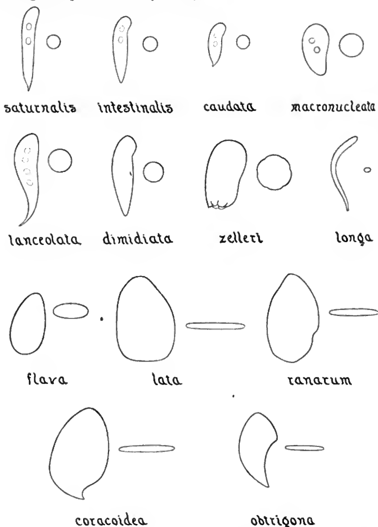
The degree of accuracy of the figures is told in each instance in the explanation of plates, any figures, or parts of figures, schematically drawn being so indicated.

Since writing the major part of this paper I have found that smear preparations of undiluted rectal contents of *Rana temporaria* give fine resnlts with cysts and free swimming individuals of *O. ranarum* and I do not doubt that eqnally good results would be obtained with other species. The method should be of especial value with the minute forms in the recta of tadpoles. The smear preparations should not be allowed to dry, but should at once, while moist, be fixed a moment in a hot fixing fluid and then be trans-

---

be nsed for storing small objects in alcohol has also proven very usefnl. Mnch of my *Opalina* material has been kept in gelatine capsules in a jar of 95 % Alcohol. (Alcohol weaker than 80 % softens the capsnles.) A further snggestion, from Dr. R. DOHRN and Dr. GAST, that the lower half of the capsnle be sealed with celloidin hefore covering with the lid is important, since with very small objects there is danger that some may get hetween the capsnle and its lid and be crushed. Before adding the film of celloidin, it is well, as Doctors DOHRN and GAST suggested, to puncture the capsnle in several places just helow its npper edge with a needle, so that the celloidin film will hold firmly. Minnte objects so stored transport without danger of breakage and the capsules require mnch less room than the glass tnbes ordinarily nsed. Furthermore there is no cotton plug in which any of the objects may be lost.

fered to cold fluid of the same sort. The heat is valuable since it makes caagulation instantaneous and the objects hold firmly to the cover-glass upon which they are spread.



Textfig. II. Outline drawings of surface views and cross sections of the known species of *Opalina*. The nuclei are indicated only for those forms that have few nuclei. The relative size of the different species is not shown. In each case the anterior end is above and the bend of the anterior end of the longitudinal axis is toward the right.

Occurrence of the species of Opalina.

We now know thirteen species of *Opalina*, twelve parasitic in tailless *Batrachia* (one of these also in *Triton*) and one in a Mediterranean fish, *Box boops*. Their occurrence is as follows (cf. Text-fig. II):

Species with two nuclei, bodies circular in cross section.

O. saturnalis, Leger & Duboscq,	in	*Box boops*, Laur.* [1])
O. intestinalis, Stein (Bloch?)	„	*Bombinator pachypus*, Bon.*
		Bombinator igneus, Laur. [9])
		Discoglossus pictus, Otth. [8])
		Pelobates fuscus, Wagl.
		Rana esculenta, L. [3])
		Triton taeniatus, Schn. [3])
O. caudata, Zeller	„	*Bombinator pachypus*, Bon.*
		Bombinator igneus, Laur.* [9])
		Bufo variabilis, Pall. [4])
O. macronucleata, Bezzenb.	„	*Bufo melanostichus*, Schn. [5])

Species with four to five nuclei, body circular in cross section.

O. lanceolata, Bezzenb.	in	*Rana esculenta*, L., var. *chinensis*, Osb. [5])

Species with many nuclei, body circular or broadly oval in cross section.

O. dimidiata, Stein	in	*Rana esculenta*, L.* [9])
		Bufo vulgaris, Laur (*cinereus*, L.).
		Bufo variabilis, Pall.
O. zelleri, Neresheimer	„	*Rana esculenta*,* [6])
O. longa, Bezzenb.	„	*Rana limnocharis*, Wigm. [5])

Species with many nuclei, body flattened.

O. flava, Stokes	in	*Scaphiopus holbrookii*, Harlan. [7])
O. lata, Bezzenb.	„	*Rana limnocharis*, Wigm. [5])
O. ranarum, Ehrb.	„	*Rana temporaria*, L.* (*fusca* Rösel).
		Bufo vulgaris, Laur.
		Bufo variabilis, Pall.*

O. coracoidea, Bezzenb. in *Rana cyanophlyctis*, [5])
O. obtrigona, Stein „ *Hyla arborea*, L.* [9]) (*viridis* Laur.).

*) Confirmed by my own observations.

[1]) Léger & Duboscq (1904 *b*).

[2]) Stein (1867), Zeller (1877), very rare in this host.

[3]) Conte & Vaney (1902).

[4]) I fonnd in Naples one toad of this species whose rectum contained a few dozen *Opalinae caudatae*.

[5]) Bezzenberger (1904).

[6]) Zeller (1877), Neresheimer (1907), Metcalf (1907 *a*).

[7]) Stokes (1884).

[8]) Cohn (1904).

[9]) Zeller (1877).

All the species of *Opalina* which I have studied live chiefly at the npper end of the rectnm of the host. A few individuals may be found scattered through the contents of the whole upper half of the rectum (this is especially true of *O. obtrigona* in *Hyla arborea*), but generally the parasites lie in one or more masses between the rectal contents on the one hand and rectal wall on the other. In frogs or toads which have been dead for some hours, the *Opalinae* are often found also in the lower part of the intestine, and occasionally, in frogs that were evidently diseased, I have found the posterior part of the intestine to contain some *Opalinae*. Several species of *Opalina* have been reported from the intestines, as well as the recta, of their hosts. It is possible that these reports are based on observations upon diseased frogs and toads, or upon those that were dead some time before they were examined. Léger & Duboscq (1904 *b*) report their new *Opalina saturnalis* as occurring in the whole intestine of *Box boops*. It would he of some interest to know if the whole intestine of normal, freshly killed fish of this species contains the parasites.

Opalina caudata and *O. intestinalis* are rarely, if ever, found in the same individual host. In the two instances in which I have found *O. zelleri*, *O. dimidiata* was also present. Zeller also found these two forms together. Neresheimer (1907), the only other student who has recorded the occurrence of *O. zelleri*, does not say whether he found it with *O. dimidiata* or not. There is a little doubt of the independence of the two species.

The frequency of infection of the several hosts by the several species is shown for the animals I examined in the following tahle. [1])

[1]) Records were not kept of a number of the hosts which were killed early in the fall of 1906, or of most killed in Naples.

	Number examined	Number containing *Opalinae*
Bombinator pachypus	105	*O. caudata* 61 *O. intestinalis* 34 Both *O. caudata* and *O. intestinalis* 1 [1]) Uncertain, either *O. caudata* or *O. intestinalis* No *Opalinae* 8 [2])
Bombinator igneus	63	*O. caudata* 25 *O. intestinalis* 15 No *Opalinae* 23 [3])
Hyla arborea	49	*O. obtrigona* 21 No *Opalinae* 28
Rana esculenta	77	*O. dimidiata* 59 *O. zelleri* and *O. dimidiata* 2 No *Opalinae* 16
Rana temporaria	15	*O. ranarum* 10 No *Opalinae* 5 (One had been starved a long time)
Bufo variabilis	4	*O. ranarum* 1 *O. caudata* 1 No *Opalinae* 2
Bufo vulgaris	1	No *Opalinae* 1

[1]) This frog was sick, the stomach being greatly distended by a very acid fluid, and the whole intestine being full of gas. The *Opalinae* in the rectum were shrunken, twisted and distorted, and in consequence the identification of the two species of parasites is not reliable. Zeller does not say whither he found these two species of parasites in the same individual host, though he describes them both from *Bombinator igneus*.

[2]) Two of these were unusually large individuals, obtained in Berlin in the spring of 1908. In one the spots on the ventral surface were of the orange color typical of *B. igneus*. In the other the color was paler orange, more nearly approaching the lemon yellow characteristic of *B. pachypus*. The size and the character of the dorsal surface showed that these animals belonged to the species *B. pachypus*.

[3]) Some of these Bombinator had been kept several months in the laboratory and were very thin.

The structure of Opalina and the phenomena of mitosis.

In the description of the strncture of *Opalina*, I will begin for each organ with the conditions in *O. intestinalis* and will then compare with the other species studied.

Cilia.

I have little to add to or to modify in Maier's (1903) discription of the cilia in *Opalina ranarum*. In all species studied the conditions of the cilia are similar. It is easy to canse the disintegration of specimens of *O. intestinalis* and *O. caudata* by pressing intermittently npon the cover-glass above them. One then sees many of the cilia, with their basal granules attached, floating freely in the salt solution. Occasionally such isolated cilia may show a few faint contractions after their complete separation from the body. Similar phenomena have been observed in ciliated cells by Klebs (1883), Bütschli (1885 *a*), Fischer (1895) and Peter (1899), and for the isolated tails of spermatozoa by numerous students (*cf.* Meves 1899 *b*).

In tangential sections of the body of any species of *Opalina*, one sees a network of fibres beneath the pellicula (Fig. 2). The spiral-longitudinal rows of basal granules lie just below the larger fibrils, the course of the two exactly coinciding. The much more delicate transverse fibrils stretch between the longitudinal fibrils, each end coinciding in position with a basal grannle. In this regard it is seen that my study confirms Tönniges (1898) rather than Maier (1903). The observation of contraction in isolated cilia shows that their movements are automatic, as Maier claims in opposition to Tönniges, bnt it seems probable that the coordination of the movements of the cilia may be connected with the presence of this network. The transverse fibrils of this network lie beneath and not in the pellicula, as accurate focussing clearly shows. The longitudinal fibrils are a little more superficial, lying apparently at the level of the outer ends of the basal granules.

Nether *O. intestinalis* nor *O. caudata* have any tnft of longer cilia at the anterior end of the body, such as Léger & Duboscq (1904 *b*) discribe for *O. saturnalis*. In *O. saturnalis* the anterior tuft of cilia is not very distinct from the adjacent cilia.

There is no posterior zone, as in *O. saturnalis*, from which the cilia are absent.

Pellicula.

All species studied have a pellicula of appreciable thickness which is quite distinct from the subjacent cytoplasm (Figs. 3, 6, 7, 8, Pl. XIV). With many stains it colors differently from the ectoplasm. Some of these differentiating stains are gentian violet, methyl violet, methylen blue, thionin, fuchsin, dahlia, Ehrlich's triacid mixture, and Delafield's haematoxylin. With methylen blue the whole ectoplasm is stained green while the pellicula is pale blue (Fig. 18, Pl. XV); with methyl violet the pellicula has a lighter shade than the ectoplasm; with thionin the pellicula is unstained while the ectosarc is green; with fuchsin the light red pellicula is readily distinguished from the more faintly colored ectoplasm. Dahlia gives perhaps the clearest picture, the pellicula being a very faint purplish gray, while the ectoplasma is purple. The contrast between the green pellicula and the blue ectoplasma after staining with Ehrlich's triacid mixture is also very marked. With all stains used the pellicula seems homogeneous.

I have not been able to demonstrate with entire clearness the minute longitudinal ridges which Maier describes as present on the outer surface of the pellicula. The longitudinal striae are very clear in surface views of tangential sections, but none of my cross sections give satisfactory views of the ridges. In some sections stained with Delafield's haematoxylin they are faintly seem. One cannot, however, doubt the accuracy of Maier's description, for his work is clearly very careful.

Zeller figures the outer surface of the body as breaking into thin narrow strips after treatement with acetic acid. He called these strips muscle threads. From my own preparations it seems probable that what he described were strands of pellicula which had separated along the course of the lines of cilia (cf. Maier, 1903, p. 80).

Ectosarc.

Sub-pellicular layer.

Immediately beneath the pellicula, between it and the usually large alveoles which fill the greater part of the ectoplasm, there is a thin layer of finely alveolar protoplasm (Fig. 8, Pl. XIV). In the outer part of this layer lie the basal granules of the cilia. Other granules, similar in size, lie more internally in the same layer. They resemble in size the granules that lie at the nodes and along the

course of the films of the endoplasmic web, but in their staining reactions they resemble more the ectoplasmic spherules soon to be described.

Alveolar layer [1]) (Figs. 4, 7, 8, Pl. XIV).

Beneath the sub-pellicular layer the ectoplasma shows many alveoles always larger, usually very much larger, than those of either the sub-pellicular layer, or the endoplasma. Methyl violet most sharply defines all the structures of the alveolar layer (Fig. 8). In sections stained with this reagent one sees that there is usnally an onter irregular row of moderately large alveoles and that within this is a second irregular row of huge alveoles. It is not difficult to understand how Maier failed to observe these alveoles in *O. ranarum*, if he used only iron-haematoxylin in staining his sections, for this reagent often gives very unsatisfactory pictures of the structure in this region (*cf.* Fig. 5). The walls of all these alveoles are delicate films along which lie scattered granules. Each alveolus, whether large or small, contains a body which, following the nomenclature of my preliminary paper (Metcalf 1907 *a*) may be called an ectoplasmic spherule. Sections stained with most reagents fail to show a fact which methyl violet clearly demonstrates, namely, that each alveolns, whether large or small, contains only one spherule.

The spherules as seen in sections vary greatly in size. In some cases, even when an alveolus is of great size, the spherule may nearly fill it. In general, the size of the spherule is roughly proportional to the size of its alveolus. The spherules are more or less irregular in form. Often, especially in sections of animals which are a little shrunken by reagents or by the heat used in imbedding, one sees the spherules showing a shape that irresistably suggests that they have been coagulated and shrunken from a more fluid substance which previously filled the alveoles. The finely granular character of these irregular spherules is not inconsistant with such an interpretation.

The ectoplasmic spherules are often clearly seen in the living animals. They have usually a distinct yellow tinge. This is emphasized by acetic acid. In many acetic-carmine preparations their yellow color is sharply contrasted with the red of the spherules in the endoplasm (Fig. 31 *a*, Pl. XV).

[1]) I make no attempt in any part of this paper to distinguish in terminology between the minutest alveoles and the larger spaces fonnd within the protoplasm, which may arise by the enlargement or fusion of minnte alveoles.

These spherules or drops of liqnid in the ectosarc stain *intra vitam* with neutral red (darkly stained after half an hour), methylen blue (deep stain), tolnidin blue (deep stain) (Fig. 20, Pl. XV). They do not stain *intra vitam* with Congo red, indigo-carmine, methyl violet, dahlia, Bismarck brown, gentian violet, thionin or eosin. With methylen blue and toluidin blue the anterior end of the body remains almost entirely unstained, showing either that the ectosarc spherules are wanting there, or are in a different condition. The study of sections shows that the ectosarc spherules are very small in that region. After *intra vitam* staining with toluidin blue (Fig. 20, Pl. XV) one finds a few bodies, larger than the ordinary ectosarc spherules, stained a mnch darker blne. These are evidently in a different condition, if they be not of a wholly different natnre. It is probable that these larger, darkly staining bodies lie in the outer part of the endosarc. Compare the results, obtained by staining with iodine and with Fischer's glycogen stain (page 218).

The statements in the last paragraph apply only to true *intra vitam* staining, the animals remaining alive and active. As the animals become inactive and die, the ectoplasmic spherules commence to stain with methyl violet, though later they again fade. If one sections animals which have been fixed in corrosive sublimate-acetic acid and stains the sections with the same dyes that were used for *intra vitam* staining, somewhat different results are obtained. Methylen blue stains the ectosarc spherules green, not blue as in life; methyl violet colors them violet like the protoplasm; dahlia stains them purple; gentian violet stains them pale violet; thionin stains them green; Bismarck brown colors them brown; thongh the last five reagents left these spherules unstained in the living animal. In the table in the appendix the color reactions of the different parts of the body to all the stains used are given. I would call attention to the fact that with safranin and light green the ectoplasmic spherules are all colored green, though with safranin when used alone they stain a good red.

The ectosarc spherules show little structure with most stains (Figs. 4, 7, 8, 9, 14, Pl. XIV). With dahlia some of the larger, more faintly stained ones show granules which seem to be peripheral (Fig. 7). Iron-haematoxylin when insufficiently extracted shows the spherules apparently homogeneous (Figs. 4, 9), but after longer decolorization one often finds them showing clearly the presence of peripheral granules and even apparently alveolar structure (Fig. 5). When found, these indications consist merely of faint dark lines

stretching across the interior of the spherule and connecting certain of the deeply stained grannles which lie at the periphery of the spherule with smaller granules in the interior. I have never seen ectosarc spherules showing indication of division.

The ectosarc spherules do not stain at all with potassium iodide, so they cannot be composed of glycogen. They do not stain at all with a solntion of iodine in aqueons potassinm iodide. They do stain strongly with safranin in sections of animals fixed in absolnte alcohol and treated, after sectioning, with tannin and potassinm bichromate. Fischer (1905) regards this staining after such treatment as indicative of glycogen, bnt the entire absence of any reaction to iodine on the part of these sphernles seems to indicate that they are not glycogen and probably are not of a substance closely related to glycogen.

It is difficnlt to form an idea of the function of the ectoplasmic sphernles. The internal strnctnre demonstrated by iron-haematoxylin, and less well by certain other stains, seems to argne against their being wholly secreted bodies. On the other hand, their position within the alveoli rather than npon the alveolar walls, wonld suggest that they are a product rather than a constituent part of the protoplasm. The fact that with certain dyes they readily stain *intra vitam* casts further donbt upon their interpretation as living constituents of the cell, though these dyes, neutral red, methylen blne, and toluidin blue, are well known to stain some kinds of living tissne in Metazoa. Léger & Duboscq (1904 *b*) think that the similar bodies in *O. saturnalis* are probably connected with nutrition and may be of a nature similar to lecithin. In the species I have studied, however, they are not soluble in warm alcohol and ether, so that they cannot be composed of lecithin. I know of nothing to indicate that they are excretory. They have no connectiou with the system of excretory vacuoles I have described (Metcalf 1907 *b* and *c*).

The ectosarc spherules are present in all species I have stndied, thongh they are very small in some forms of *O. dimidiata.* In *O. caudata* they resemble closely those of *O. intestinalis.* In *O. ranarum* and *O. obtrigona* they are smaller, but otherwise similar. In *O. zelleri* they are still smaller, but are clearly recognised. In *O. dimidiata*, in all bnt the minnte forms in the spring and the young forms in the tadpole, one almost fails to find them with certainty, for, they are little if any larger than the largest of the ordinary granules of the ectosarc. On the other hand, yellow ectosarc spherules of large size are abundant in this species in the

macrogametes and other small forms from the tadpole, except possibly the microgametes, and also in the smallest forms found in the spring in the rectum of the frog. I regret that my notes do not say as to the presence of the ectosarc sphernles in the microgametes of *O. dimidiata* and I do not remember with certainty, thongh I think they are present and of good size in this species as in the microgametes of *O. intestinalis* and *O. caudata.*

It is not easy to be certain who of the students of the *Opalinae* have seen the ectosarc spherules, for, excepting by Léger & Duboscq (1904 *b*) for *O. saturnalis*, they have not been figured or clearly described. Tönniges (1898) describes for *O. ranarum* certain greenish granules, disc-shaped, elongated, or of irregular form, and varying in size. He says that in most individuals they lie exclusively in the endoplasm and goes on to describe at considerable length their minute structnre. In the main his description applies surely to what I have called endosarc sphernles (Metcalf 1907 *a*), but the greenish color he ascribes to these is characteristic of the ectosarc spherules. Tönniges has not distinguished between the two kinds of spherules and it may be that the greenish color of the onter ones has been ascribed by him to them all. Conte & Vaney (1902) have evidently not distingnished the ectosarc spherules. Neresheimer (1906 and 1907) describes remarkable phenomena connected with certain disc-shaped spherules. I am not snre I understand correctly his description, but it seems to apply to the larger ectoplasmic spherules and not to the smaller sort of spherules which lie in the endoplasma. He says that these disc-shaped bodies change into spherical or ovoid spherules into which the reproductive chromidia migrate, each spherule with its chromidia constituting a new reprodnctive nncleus in which the spherule furnishes the achromatic portion and the chromidia the chromatic portion of the new nucleus. The conditions in *O. intestinalis* previons to and during the spring sexnal reproduction preclude any snch interpretation, useless *O. ranarum*, upon which Neresheimer worked, is fnndamentally different from the binucleated species. *Opalina ranarum* is a far less favorable species than the binucleate forms for the study of the ectosarc spherules, for in *O. ranarum* they are not only proportionally bnt actually much smaller.

Endosarc.

The endosarc of all the species of *Opalina* I have stndied shows usually a finely granular and fibrous appearance in which the real

foam-like alveolar nature can hardly be discerned. Occasionally one finds individuals whose endosarc clearly shows the alveoles, especially when stained *in toto* with Delafield's haematoxylin (Figs. 15, Pl. XIV, 87, Pl. XX), or in section by Ehrlich's triacid mixtnre. Mayer's haemalnm after Flemming's fluid shows the same structure bnt less clearly. The clearest pictures of the alveoles of the endosarc are found in very small individuals of *O. dimidiata* and *O. obtrigona*. The strncture in *O. intestinalis* is the same, but is a little less clearly seen.

The endoplasma differs markedly from the ectoplasma in the very mnch smaller size of its alveoles, which are very minute. The nodal granules of the endosarc (Fig. 15, Pl. XIV) resemble in size the granules which lie at the nodes and along the films of the ectosarc foam. The endoplasmic alveoli are usually so minute that one is unable to see if any grannles lie along their walls at other points than the nodes of the foam. When however one finds an animal in whose endoplasma some of the alveoles are enlarged, the walls of the alveoles are seen to bear freqnent grannles.

The endoplasma in *O. intestinalis* is more dense in the anterior end of the body, in front of and near the anterior nuclens. In all other species stndied a similar greater density of the endoplasm in the anterior end of the body is observed, though it is less noticeable in the flattened species, especially in *O. ranarum*.

Endosarc spherules (Figs. 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 16, Pl. XIV).

In the endosarc are many refractive bodies which I have called endosarc spherules (Metcalf 1907 *a*). They have been observed by most of those who have stndied *Opalina*. Zeller describes little refractive bodies in the "parenchyma" of each of the five species of which he treats. These he says are slightly flattened and disc-shaped, and show a central dark spot which may be due to the presence of a central cavity or to a hollow in each face of the disc. He says their diameter is about 0·004 mm.

Barfurth (1885) describes for *O. ranarum* certain masses of "glycogen" which stain brown with iodine, and near them many light yellow strongly refractive drops of another substance ("fat?"). The latter were probably the refractive spherules.

Tönniges (1898) describes minutely the structnre of the spherules as they appear in sections of *O. ranarum* stained with iron-haematoxylin. I can confirm his statements that they are disc-shaped,

elongated, or irregular in form and are of various sizes; that they lie usually [in this species] in a regular direction in the whole body, the flat side of the disc [when they are disc-shaped] being parallel to the surface of the body, so that in sections parallel to the flattened surfaces of the body one sees them almost all circular, while in other sections they appear almost all rod-shaped; that they appear homogeneons when strongly stained with [most] aniline dyes; bnt not so with [well extracted] iron-haematoxylin; that they show an alveolar (?) structnre; that one often finds them constricted in the middle like a dumb bell; that they are insoluble in alcohol, alcohol and ether, strong acetic acid, or weak mineral acids; that they are soluble in concentrated mineral acids. I can add that they are but slightly colored by osmic acid; that they are insolnble in cold water; that they are insoluble in tannic acid; that after boiling with hydrochloric acid or after digesting them with diastase, the solntion gives no sugar reaction with Fehling's solution (not a very delicate test); that they do not stain at all with potassium iodide; and that for the most part they do not stain with iodine dissolved in a water solution of potassium iodide, though occasionally some of them in some part of the body stain a good brown with the iodine solution.[1])

It is of interest that, when treated with this iodine solution, most of the individuals of *O. ranarum* used for experiment did not stain at all; a few showed brown color in some large irregular masses which seemed to be on one side or the other of the boundary between ectosarc and endosarc, probably in the endosarc; many showed a diffuse brown stain in the endosarc in one or more regions of the body, this diffuse stain usually not affecting the spherules, though in a few instances the spherules in these stained areas were themselves tinged with brown. Heat does not change the stain; adding strong sulphuric acid darkens it but slightly and does not give a red or violet tone.

In *O. caudata* there is no color reaction to potassium iodide; the reaction to iodine dissolved in a water solution of potassium iodide is similar to that described in *O. ranarum*, except that I fonnd that the whole endosarc in all individuals stained strongly and a more reddish brown, the ectosare, like that of *O. ranarum* showing only a faint yellow tinge. Addition of strong sulphuric acid darkens

[1]) Glycogen is said to stain reddish brown with potassium iodide or with iodine, the color disappearing upon heating. If sulphuric acid be added to the stained glycogen the color is said to become redder or show a violet tone. (See especially Barfurth 1885.)

the color of the endosarc stain but does not seem to make it more red or to give it a violet tone. The substance in the endosarc which stains seems for the most part to be in solution, though here and there dense irregular masses are seen which seem as if coagulated. The endosarc spherules also stain, but less strongly than the protoplasm.

Individuals of *Nyctotherus* and *Balantidium* on the same slides with the *O. ranarum* and *O. caudata* show no reaction to potassium iodide. With iodine dissolved in a water solution of potassium iodide they show dark brown bodies in the endoplasma, the endoplasma itself, like the ectoplasma, being merely tinged with yellow.

Fischer (1905) has described a method of treatment which he says gives a distinctive stain for glycogen. The tissue containing the glycogen is fixed in absolute alcohol, sections are made by the paraffin method, these are brought through graded alcohols into a ten percent solution of tannin (to precipitate the glycogen) and are then placed in potassium bichromate to render this precipitate insoluble in water. Ofter washing the sections they are stained in safranin, only the glycogen bodies becoming red, the cytoplasm and nuclei being hindered from staining by the treatment with tannin. I tried this stain upon sections of *O. dimidiata.* The rectum of a *Rana esculenta* was opened and the contained Opalinas and Balantidiums were divided into two parts, one lot being fixed at once and stained according to Fischer's directions; the other lot was kept two days in a solution of sodium chloride until the infusoria were mostly inactive, then they were fixed and stained by the same method. In the sections of the first lot of Opalinas, killed before starving, the ectosarc spherules were a bright red. In most individuals the endosarc was wholly unstained: in other individuals the endosarc was strongly stained, great irregular red masses, of what appeared like coagulated material, completely filling it; in still other individuals but little color and few masses of coagulum were seen in the endosarc. The endosarc spherules were usually unstained but in some animals with well stained endosarc and coagulum the endosarc spherules were also stained, but showed a fainter red than the protoplasm.

In the sections of *Opalinae* which were starved forty-eight hours before killing and staining, the ectosarc spherules were stained as strong a red as in the other sections. In almost all individuals the endosarc was wholly unstained; a few individuals, on the other hand, showed red masses of coagulum in the endosarc, the whole endosarc being stained. In all the Opalinas on this second lot of

slides the endosarc spherules were present in their usual abundance but were unstained.

In the *Balantidia* on both lots of slides there were abundant spherules in the endosarc which took the safranin well, each spherule showing a red peripheral layer and an unstained or faintly stained core.

The natural interpretation of all these microchemical tests and digestion experiments seems to be: 1) that the endosarc of *Opalina* contains a nutrient substance abundant in freshly taken *O. caudata* and in many individuals of *O. dimidiata* and in parts of the body of many individuals of *O. ranarum*; in starved individuals its presence is infrequent. This nutrient material seems to be usually in solution in the endoplasma, though even in living animals it may form some irregular semi-solid masses. In some cases the endosarc spherules as well as the endoplasma seem to be permeated by the nutrient fluid, but usually they are not so. 2) The nutrient substance is not true glycogen, but seems to be related to glycogen. The term paraglycogen which Bütschli has suggested seems to be appropriate. 3) The endosarc spherules are not oil for they do not stain with osmic acid or dissolve with alcohol or ether or xylol. 4) The endosarc spherules are not lecithin for they do not dissolve when warmed for four hours with a mixture of equal parts of absolute alcohol and ether. 5) The ectosarc spherules for the same reasons are neither oil nor lecithin. 6) Probably neither sort of spherules contains true glycogen; whether they contain any related substance is uncertain. I have failed to get a sugar reaction with Fehling's solution after diastatic digestion, but this test is not a very sensitive one. 7) The spherules of the endoplasma of *Nyctotherus* and *Balantidium*, seem to be composed of paraglycogen. It is, of course, natural to suppose that those of *Opalina* are of a somewhat similar nature, but they are not exactly similar chemically, as is shown by the difference in their reaction to iodine and to Fischer's glycogen stain.

The whole subject of the nutrient fluids and refractive bodies in the cytoplasm of the *Protozoa* needs more successful study than it has yet received. For valuable papers upon the subject see Certes (1880), Maupas (1885, 1886), Barfurth (1885), Bütschli (1885 *b*, 1880—1889 and 1906 [1])), Stolc (1900) and Bott (1907).

[1]) In some way I overlooked this valuable paper of Bütschli's upon the paramylon bodies of *Euglena*, and I have not yet had opportunity to study the spherules in *Opalina* in the light of Bütschli's work. There is much divergence

Contrary to Tönniges (1898) I do not find the endosarc spherules much, if any, more numerous near the periphery of the body even in *O. ranarum.* Tönniges says that these spherules very frequently divide. According to his description they become first dumbbell-shaped, then still more constricted, the connecting portion becoming a mere thread and then breaking, the two halves separating. He says that, before division, a spherule becomes smaller and more dense, loosing its visible alveolar structure, doubtless by exuding the liquid in the alveoles, and that in this condition they stain more strongly. In my preparations, the dumbbell-shaped spherules are not on the whole smaller than the others, nor do they show less internal organisation (Figs. 11 and 10, last two spherules, Pl. XIV).

Kunstler & Gineste (1905) describe the endosarc spherules of *O. dimidiata* as containing a central granule. They say the spherules divide by constriction, the central granules first dividing. This I cannot confirm.

I am unable to convince myself that the endosarc spherules divide. The dumbbell-shaped forms are not infrequent, but after long search I have not found a single spherule in which the connecting portion is very slender as if ready to part. By for the most constricted one I have seen is shown in Fig. 11. This point is an important one, affecting the question of the nature of these bodies, so I have studied it with care. At the time I wrote my preliminary paper (Metcalf 1907 *a*) I assumed that the frequent dumbbell shape indicated division, but I now think that these bodies do not divide any more than do the ectosarc spherules. One never finds two of either sort of spherule in one alveole or any other indication of division in them.

The endosarc spherules are more numerous in the anterior part of the body, where the endosarc itself is denser (Fig. 1).

In *O. obtrigona* certain strands of minutely alveolar protoplasm stretch out from the endosarc and, passing between the large alveoles of the ectosarc, join the subcuticular layer (rather poorly shown in Fig. 6). Along these strands, and in the subcuticular layer near the outer ends of the strands, one finds endosarc spherules. In no other species have I seen the endosarc spherules outside the limits of the endosarc proper.

---

even among the *Ciliophora* as to the character of their refractive spherules, and it is probable that the spherules in *Opalina* are more or less different from those in *Euglena.*

The endosarc spherules stain well *intra vitam* with neutral red, methyl violet, dahlia, and gentian violet. This fact makes it doubtful if they are living constituents of the cell.

The spherules of the endosarc are so similar, in all the species I have studied, that no distinctions of size, strncture or reaction to stains can be described. The questions of the origin, nature and functiou of these spherules will be further discussed after the description of the nucleus has been given.

One must agree with Tönniges (1898) that there is no indication that the endosarc spherules are either excretory or parasitic. To his interpretation of them as a diffuse macronucleus we will refer again.

Conte & Vaney (1902) believe that the spherules arise in the nnclens from chromatin and wander out into the cytoplasm through the nnclear membrane. They think that they are similar to zymogen grannles in gland cells and to yolk nuclei. To this we will return again.

Maier (1903) fails to confirm Tönniges' description of internal strncture in the endosarc spherules, saying that they are homogeneous. It must be that in the sections upon which this statement is based the haematoxylin (Haidenhain's) was insufficiently extracted (*cf.* Fig. 4). Sufficient extraction of the stain always shows the internal structure.

Léger & Duboscq (1904 *b*) figure certain apparently similar bodies in what seems to be a microgamete of *O. saturnalis* (my Text Fig. XVII, page 338), and their Fig. 3, representing an optical longitudinal section of a full grown form of this species, shows in the endoplasma deeply staining bodies of the right size and form to represent endoplasmic spherules, yet these anthors say that the endoplasma is withont particular inclnsions, though showing here and there small spherical vacuoles with very sharp coutours. This appearance of vacuoles is exactly what is seen after staining with borax-carmine, Mayer's or Delafield's haematoxylin, or any of the unmerous dyes which do not color the endoplasmic spherules.

Kunstler & Gineste (1905) interpret the endosarc spherules as a "secretory apparatus".

Neresheimer (1907) did not see any alveolar structnre or any division stages in the endoplasmic spherules. He snggests that Conte & Vaney's description of the origin of the spherules from the nuclens may indicate that they saw the formation of reproductive chromidia, a process which Neresheimer describes at length. I feel

confideut, however, that Conte & Vaney, who worked on *O. intestinalis*, refer to certaiu very evident chromatin spherules in the nucleus, which will soon be described.

Excretory organs

(Figs. 1, 17, Pl. XIV; 97, Pl. XXI; 248—250, Pl. XXVI).

A system of excretory vacuoles is present in the axis of the body. I have published a description of these organs (Metcalf 1907*b* and *c*) for the full growu forms of *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. obtrigona* and for the small spring individuals and the macrogametes (not the microgametes) of *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. dimidiata*. Reference must be made to this very primitive excretory organ when we discuss the relationships of *Opalina*, so I include here a few figures showing its character, and summarize the chief points in the pnblished description.

In *O. intestinalis* (Fig. 1) the excretory organ, when highly developed, consists of an axial series of more or less irregular fnsed vacnoles, opening to the exterior by a transient aperture at the posterior end of the body, and stretching forward usually as far as the posterior nucleus, or often nearly to the anterior end of the body. In its conrse, as it passes the posterior nnclens, it lies close against the nuclear membrane, usnally bending spirally around it. It often has a similar relation to the anterior nncleus. Frequently the series of fused vacuoles branches behind the posterior nucleus, the branch running along another side of the posterior unclens, which is thus almost enveloped by the excretory organ. I have recently fonnd full grown *O. intestinalis* and *O. caudata* in which the excretory organ stretches as far forward as the anterior nucleus. Heretofore I had seen the elongated excretory organs only in small forms in the spring.

Generally the posterior end of the organ in *O. intestinalis* shows one or more enlargemeuts of considerable size surronnded by unusually large granules iu their walls (Fig. 97, Pl. XXI, also cf. Metcalf 1907b). Usually one sees a mass of snch larger granules iu the cavity of the posterior chamber. These grannles staiu somewhat differently from the ordinary endoplasmic grannles with most stains. They are from time to time extruded from the excretory aperture at the posterior end of the body and are cast away. One often sees individnals dragging after them a mass of these extruded granules (Figs. 248, Pl. XXVI, 147, 153, Pl. XXII).

In *O. caudata* the conditions are very nearly the same, but the posterior end of the organ is nsually branched, one or two shorter branches being seen in addition to the chief branch which runs forward along the axis of the body. The relation to the nuclei is like that in *O. intestinalis* and the excretory granules are similar.

In *O. dimidiata* (Fig. 17) the conditions resemble those in *O. intestinalis*. In this species there are many nuclei. One often sees that most, if not all, of these nuclei are surrounded by narrow perinuclear vacuoles. Many of the posterior nuclei are enveloped by the excretory orgau. Probably by no means all of the perinuclear vacuoles have any direct connection with the excretory organ, bnt their contained excreta probably reach the excretory vacnoles by dialysis through the intermediate alveoles of the endoplasm. In Fig. 17, Pl. XIV, which represents the posterior end of an unusually slender but nearly full grown *O. dimidiata*, the axial series of excretory vacuoles is very clearly seen to consist merely of enlarged and irregularly fused alveoles of the endoplasm. The most posterior nucleus, in mitosis, is shown entirely enveloped by the excretory vacuoles. One often sees individuals of *O. dimidiata*, especially small forms in the spring, dragging behind them masses of extruded excretory granules.

The three species already mentioned are circular in cross section and have the excretory vacuoles along the axis of the body. *O. obtrigona* and *O. ranarum* are very flat. It is possibly becanse of this flattening that their excretory organs are so much less developed. In *O. ranarum* I have found no trace of any excretory organ, though one often finds perinuclear vacnoles present. In *O. obtrigona* there is present only a slight rudiment of the posterior end of the excretory organ in the form of a small elipsoidal or semilunar vacnole at the extreme posterior tip of the body. This vacuole occasionally contracts and one sees the shrunken, depressed contour where the vacuole previously was. No excretory grannles have been found in this vacuole, nor have I seen the living animals dragging a mass of extruded granules after them, as is so frequent in the three spindle-shaped species above described.

Excretory organs have not been seen before in *Opalina*, the genns being always described as nnique among the *Ciliata* in having no excretory vacnoles.

The condition of the excretory canals in the new Ciliate *Pycnothrix monocystoides*, described by SCHUBOTZ (1908) is very interesting in comparison with the cylindrical Opalinae. This simple axial

system of irregular, branching canals is more developed than the excretory organ of Opalina in having 1) a definite limiting membrane, 2) a permanent external aperture, and 3) cilia lining the outer portion of its duct, and also in being evidently a permanent organ of the cell.

In my first paper on the excretory organs of *Opalina* (Metcalf, 1907*b*) I wrote: "Under pressure from a cover-glass, in gradually drying preparations, oil globnles are generally protruded from the body at different points on the periphery. The largest of these oil globules is generally found at the posterior end of the body" [in connection with the excretory pore] "and is usually the first to appear, in spite of the fact that the posterior end of the body is the most slender part and mnst be the last to feel the pressure." Further observation shows that I was mistaken in describing any special connection between the excretory pore and an especially large drop of this exuded liquid. Often a drop is fonnd here and it may be large, but observation of a much larger number of *Opalinae* under pressnre shows that it was an error to emphasize the size and early appearance of this drop. The exuded liquid is not oil, but is either the protoplasm itself, or is derived from the protoplasm. It cannot be derived from the ectosarc spherules, for similar exuded drops are found in *Ciliata* which have no ectosarc spherules (*cf.* also Kölsch 1902).

Nucleus, and mitosis.

Few if any known nuclei among the protozoa are clearer and better for study than those of *O. intestinalis* and *O. caudata;* the nuclei are large and the chromatin is small in amount and does not obscure the achromatic structures; the chromosomes are few in number, eight in *O. intestinalis* and six in *O. caudata;* all the structures usually found in typical nuclei, including a plasmosome nucleolus, are present and stain readily and distinctively; and, as already mentioned, all the structurec in the nucleus are sometimes very clearly seen in the living animal. I have therefore given chief attention to the nnclear phenomena, especially those of mitosis.

Opalina intestinalis has nsually two ovoid nuclei lying in the anterior half of the body, sometimes in the anterior third (Fig. 1 and Pl. XVII, Fig. 38). The ends of the nuclei which are tnrned towards each other are generally more or less pointed. Commonly these pointed ends are connected by a more or less elongated delicate strand consisting of the attenuated nnclear membrane, which was

constricted in the middle at the last division and drawn out to a thread (Pl. XVI, Figs. 34, 35, 37). This thread persists for a long time, disappearing, generally, as the two nuclei are entering upon the next division. Frequently the connecting thread is much bent or even coiled, being far longer than the shortest line between the two nuclei (Figs. 35 and 37), a condition which suggests that the thread elongates by its own growth.

The two nuclei divide at the same time, becoming first spindle-shaped, then dumbbell-shaped, and finally separating into two daughter nuclei which are still for a long time united by the thread which indicates their common origin. While the division of the two nuclei is occurring, the body divides (Pl. XVII). This is usually during the anaphases, but one often finds the body still but partially divided when the nuclei are entering on the telophases. One often sees a daughter cell with only a single nucleus, but this, if normal, is always in an anaphase or early telophase stage of division (Figs. 32, Pl. XVI; 43, Pl. XVII; 54, Pl. XVIII). It is during the early telophase that the nucleus constricts into two (Figs. 32, Pl. XVI; 60—65, Pl. XIX).

The nuclear membrane is very definite and clear, not thick, but very firm and strong. This is indicated by the fact that the connecting strand between the daughter nuclei persists for so long a time. It is seen even more clearly when the living animals are crushed by pressure upon the cover-glass, causing the nuclei to come out into the surrounding salt solution. Such isolated nuclei, even when connected by very slender threads, one seldom succeeds in causing to break apart by the most violent currents one can produce by pressing upon the cover-glass. Often one of the two united nuclei will be held in place by its connection with the broken body, while the other nucleus projects into the clear liquid. One can then make it jerk about and tug violently upon the thread that holds it, yet without breaking the thread. I kept one such pair of nuclei for three days, trying several times daily to break the thread by violent currents, but even the third day it held as firmly as ever. It is very evident that under this severe treatment the thread connecting the nuclei does not stretch. It seems not to be at all elastic.

Conte & Vaney describe the endosarc spherules as arising from the nucleus, from which they emerge *through an opening in the membrane*. We will return again to this point. It is well here merely to emphasize the remarkable toughness of the nuclear membrane, which could be penetrated only with the greatest difficulty, unless it were weakened (chemically?) at some point.

The nuclear membrane never disappears even during mitosis.

The nuclear membrane shows no structure. Under all conditions, whether living, or after treatment with acetic acid, silver nitrate, or fixing agents without staining, after all sorts of staining in total preparations or in sections, one finds it always appearing homogeneous and uninterrupted. There are no indications that the achromatic structures in the nucleus are in any way continuous through the nuclear membrane with the structures of the cytoplasm. Of course in each division the membrane is ultimately broken at the point of constriction, but this break occurs in the slender connecting thread at a distance from the cavities of the daughter nuclei and there are no wounds at the surface of either nucleus.

The nucleus lies in the cytoplasm, as it were in a great alveolus, being suspended and held in place by the films of the cytoplasmic foam. Fig. 205, Pl. XXIV, gives a clear picture of this condition in the case of a male pronucleus in a zygote of *O. intestinalis.*

The resting nucleus (Pl. XX, Figs. 76 and 77).

The phrase "resting nucleus" of course does not imply that the nucleus is inactive physiologically, but only that it is not engaged in the movements which constitute or accompany mitosis. One can hardly speak with propriety of such a resting stage in the nuclei of *O. intestinalis,* for there seems to be no time throughout the year when changes in their visible structure are not constantly occurring. The divisions of the nuclei and of the body never cease, and every nucleus seen is either in actual division or is preparing for or recovering from division. There is no condition in which the nuclei seem to pause for any prolonged period. The stage which corresponds to the ordinary resting nucleus of metazoan cells is probably that in which the chromatic network is most branched and diffuse. I will begin the description with the stage just prececding the formation of the mitotic spindle.

Achromatic foam.

The whole space within the nuclear membrane is seen to be filled with alveolar protoplasm, the alveoles in many places being fused to form vacuoles of different sizes (Fig. 77, Pl. XX). In many other nuclei the alveoles are not fused but are of fairly uniform size (Fig. 69, Pl. XIX). Granules of varying sizes and irregular

shape lie at the uodes of the foam. These are highly refractive in the living nucleus (Pl. XVI). Their reaction to stains shows them to be of achromatic, not chromatic, material. The granules not only differ in size in the same nucleus, their average size in different nuclei varies perceptably. They seem largest in nuclei in which the spindle is forming preparatory to mitosis (Fig. 47, Pl. XVIII). The lines uniting these granules (optical sectious of the walls of the alveoli) generally show very clearly in well-stained nuclei both in preparations of total objects and in sections. The lines are not discernable in living nuclei, at least with the illumination I have used.

Nucleolus (Figs. 18, 19, 22, 25, 27, 29, Pl. XV; 55, 56, Pl. XVIII; Fig. 73, Pl. XIX).

The always spherical, or uearly spherical, nucleolus belongs to the achromatic group of nuclear structures. It is always present iu fully formed nuclei and lies near the axis of the nucleus, never at the surface. It is held in an alveolus of the achromatic foam (Fig. 55, Pl. XVIII), completely filling this alveolus, so that the films of the foam are seen radiating from its surface. Where these strands touch the surface of the nucleolus they are seen to enlarge to form typical nodal granules, triangular in optical section, as are many of the other nodal granules.

The nucleolus stains strongly with plasma stains. One does not find it in total preparations stained with borax-carmiue, but in many Delafield haematoxylin preparations it shows very distinctly and is sharply distinguished from the chromatiu by its fainter color and browner toue. Iu other Delafield haematoxylin preparations, which are not so well decolorized, one often cannot distinguish the nucleolus from the chromatin. The most selective and distinctive stain for the nuclear structures is safranin followed by light green (*Lichtgrün*). The chromatic elements take the safranin strongly while the achromatic elements are green. With this stain the uucleolus is a clear bright green aud is a very conspicuous object, for it is large (Figs. 22, 25, 27, 29, Pl. XV). Often with light green, and still better with Delafield's haematoxylin, one sees that the nucleolus is not homogeneous, from one to teu or more circular lighter areas being visible within it (Figs. 55, 56, Pl. XVIII; 73, Pl. XIX). Generally the more central light spot appears the larger. These vacuoles (?) are generally of different sizes in the same

nucleolus and their average size may be different in different nncleoli. As a rule the size of the vacuoles is in inverse proportion to their number.

Sections stained with methylen blue often show an interesting condition in many nucleoli (Figs. 18 and 19, Pl. XV). The nncleolus proper is stained a bluish green. This portion is spherical. In one or two regions on its periphery, it bears cap-like structures which are stained a clear blue darker than the pale blue of the nucleolus proper. This is no accidental condition, for it is present in almost all nuclei seen upon these slides which were made from two different lots of Opalinas. Vacuoles are not seen in the nucleoli which show these blue caps, though in other nucleoli upon the same slides vacuoles are found. The history of these peculiar nucleoli has not been followed, so nothing can be said as to the meaning of the conditions found.

The behaviour of the nucleolus in dividing nuclei is interesting. Zeller observed that in dividing nuclei the nucleolus did not divide but remained intact in one of the daughter nuclei, the nucleolns of the other daughter nnclens being a new structure. I can fully confirm this for *O. intestinalis* and *O. caudata*. The nucleolus is less easy to see in the smaller nuclei of the multinucleated species, and as my material of the multinucleated forms shows comparatively few nnclei in division I have not taken the considerable time required to study the nucleoli carefnlly in them.

To Zeller's interesting observation I would add the fnrther facts: — first, that in *O. intestinalis* the old nucleolus remains in the posterior of the two danghter nuclei (Figs. 70—72, Pl. XIX), and second, that in *O. caudata* this relation is usually reversed, the old nucleolus remaining generally in the anterior daughter nncleus (Fig. 82, Pl. XX). In the many hundreds of nuclei of *O. intestinalis* examined I have fonnd but a single exception to this rule (Fig. 74, Pl. XIX). In this young daughter cell whose nuclens is still in the dnmbbell stage of division, the nncleolus was fonnd in the anterior part of the nucleus near the constriction. The narrow tnbe connecting the daughter nuclei was not too small to allow the nucleolus to pass through it and reach its usual position in the posterior danghter nncleus, but that the nucleolus would have done so does not seem very probable.

In a large majority of cases, in dividing *O. caudata* the old nncleolus remains with the anterior danghter nucleus, yet one occassionally finds these relations reversed.

One of course must iuquire as to the meaning of this puzzliug difference between the two species. I can snggest no adequate explanation. The uuclei lie much fnrther forward in *O. intestinalis* than in *O. caudata* (compare Fig. 38, Pl. XVII, with Fig. 81, Pl. XX). It suggests itself that the nncleolus in both species may remain iu the nncleus which is nearer to the center of the body, or rather nearer to the protoplasmic rather than the geometric center of the body. The geometric and protoplasmic centres are uot the same, for the protoplasm in the anterior part of the body is more dense than that further back. This suggestiou fits the conditions in *O. intestinalis* and, for the most part, also, the conditions in *O. caudata*. If one takes into account the greater density of the auterior part of the body, it is true that iu *O. caudata* in the cases in which the old nucleolus remains in the auterior daughter nucleus it is nearer the center of the protoplasm. I have looked through many preparations, comprising many huudreds of *O. caudata*, to see if in cases iu which the old nucleolus remained in the posterior daughter nucleus the nuclei were unusually far forward, so that the protoplasmic center might in these cases be nearer to the posterior thau to the anterior nucleus. In the majority of instauces of this sort it was found that the nuclei were unusually far forward, almost as much so as iu *O. intestinalis*, but, unfortnnately for my suggestion, no less than six instances were found in which the old nucleolus remained in the posterior daughter nucleus, although this was placed not only uot exceptionally far forward but even unusually far back. I believe, therefore, that there is probably no worth in the suggestion made.

The uew uucleolus in the daughter nnclens of *O. intestinalis* arises always at the pointed end of the uucleus near the thread which connects it with its sister nucleus (Fig. 72, Pl. XIX). At first it is very small. It grows rather slowly, but by the time the uucleus is ready for its next division the nncleolus is again of full size.

I have little suggestion to make as to the nature or function of the nucleolus. I would merely emphasize 1) that it is wholly distinct from the chromatin elemeuts and never at any time has any discernable genetic relatiou to them; 2) that a nucleolus once formed persists throughout the year and until the nucleus containiug it is ready to throw off its vegetative chromidia and enter upon sexual reproduction (processes which will be described later). I have uot fouud nucleoli in the nuclei of any forms betweeu the

time of extrusion of the vegetative chromidia and copulation, though I have stained sections of all of these forms with safranin and light green, which gives such clear pictures of the nucleolus. In at least some zygotes which have grown a little since copulation, the nucleoli are seen. Its apparent absence from those nuclei which have recently cast off vegetative chromidia, and are probably but slightly active in nutrition, seems of much interest, though I would not venture to suggest what may be the real meaning of this relation. In the case of large dividing individuals in the summer, fall and winter, the new nucleolus appears in the anterior daughter nucleus at the time when this nucleus is forming the chromatin spherules, which seem to be essentially vegetative chromidia. These phenomena will soon be described. It seems probable that the nucleolus has some connection, not necessarily causal, with the nutritive activities of the nucleus. 3) In the third place I would emphasize that the new nucleolus, when it arises, seems to come from some substance in liquid form in the nucleus, and not from the immediate transformation of any previously visible structures. 4) The old nucleolus does not grow beyond a certain size, though it may persist for nearly a year. The new nucleolus, after each division, grows to the same size as the old and then stops its growth. This suggests that there is some balance between the nucleolus and the other structures of the nucleus (or cytoplasm?) which requires the presence in an ordinary fully-formed nucleus of a nucleolus of a given size. The diminution of the vegetative chromatin, preceeding and during the period of conjugation, seems to do away with the necessity of a nucleolus during that time, or to remove something which if present would have caused a nucleolus to form.

The various stages in the growth of the new nucleolus are of great assistance in determining the sequence of phenomena in the telophases of mitosis. Until this criterion was found it was almost impossible to be certain of the relative order in mitosis of several of the stages observed.

This description of the condition and behavior of the nucleolus in *O. intestinalis* is based upon series of preparations of animals from many different hosts. I have since studied a series of preparations of apparently normal Opalinas from an apparently normal *Bombinator*, in which the nucleolar relations are quite different. These Opalinas were killed at once upon opening the rectum of the host so that the divergent condition of the nucleolus is not due to degenerative

changes cansed by living in cnltnres. In all of these animals, when binucleated, one nnclens contains a nucleolus and the other does not. Generally the nucleolus is in the posterior nnclens, bnt in 8 % of the binucleated forms the nucleolus is in the anterior nucleus. All of the forms found with the nncleolns in the anterior nncleus were anterior danghter cells formed by transverse division indicating probably that about 16 % of the divisions are transverse.

The conditions in these Opalinas show that the old nucleolus does not persist. It diminishes and disappears just before, or during, or some times just after, the spireme stage, which in these animals is less marked than usnal. It reappears generally at about the time the spindle is forming for the next division, or before. Occasionally it does not appear nntil the spindle is formed. We find therefore some animals with no nncleolus in either nncleus (spireme stage), some (8 %) with a nucleolus in the anterior nucleus only, and the rest with a nucleolus in the posterior nuclens only.

The discrepancy betweeu the different series of preparations as to the condition of the nncleoli necessitates more careful study of this subject. My notes npon the several sets of preparations do not say whether the hosts had been starved for a time or not. Until this relation has been carefully, observed one cannot be certain which of the nucleolar phenomena are normal and which abnormal. Possibly all are normal, varying with the conditions of nutrition. It is but a surmise that the conditions of nutrition explain the divergent conditions of the nucleoli, bnt it seems the most probable explanation *Opalina* must be very sensitive to surrounding conditions, and it is possible that in this genus we have an opportunity to study, with unnsnal hope of some sneccss, the problem of the function of the plasmosome nncleolus.

Zeller saw and clearly described and figured nncleoli in all stages from the cysts to the full grown forms, in all five of the species he studied. He even figures a central dot in the nucleolus, which he calls a central vacuole. It is barely possible that in the cysts and in certain small forms he has mistaken certain chromatin masses for the true nucleoli, but there is no doubt that, at least in the case of full grown forms, he has described the trne plasmosome nncleolns. This is easily demonstrated with acetic acid, which is the reagent he chiefly used.

Since Zeller, no stndent of the *Opalinae* has observed the true nucleolus. Pfitzner (1886), Tönniges (1899) and Léger & Duboscq (1904*b*) refer to certain chromatin masses as nncleoli, bnt make no

reference to the plasmosome nucleolus. Neresheimer (1907) says he has not seen a true nucleolus, not accepting the name nucleolus as applicable to the masses of chromatin described by Pfitzner, Tönniges, and Léger & Duboscq. Neresheimer is surely right in not applying the name nucleolus to the chromatin masses so characteristic of the nuclei of *Opalina*. They seem so entirely unrelated to the true plasmosome nucleoli that no one term should be applied to both. One must admit, however, that in some other animals it is not easy to distinguish clearly between plasmosome nucleoli and bodies related to chromatin, so that in general the word nucleolus must be allowed to have the broader meaning.

Chromatin.

The chromatic material of the nucleus in *O. intestinalis*, and all other species studied, lies near the surface of the nucleus just beneath the membrane (Fig. 59, Pl. XVIII).[1]) This seems to be true of all conditions of the nucleus except just before, during, and after encystment, when, in the multinucleated species, the chromatin contracts toward the centre of the nucleus. One sees in the resting nucleus that there are irregular masses of chromatin, of larger and smaller sizes, scattered here and there beneath the nuclear membrane (Figs. 23, 27, Pl. XV; 45—48, Pl. XVIII; 76, 77, Pl. XX). These chromatin masses are drawn out into numerous points each of which connects with a fiber of chromatin which runs over the surface of the nucleus beneath the membrane. These fibres branch and the branches anastomose with one another and with the branches of similar fibres from other chromatin masses (Figs. 27, Pl. XV; 46, Pl. XVIII). In other words, there is just beneath the nuclear membrane a network of chromatin fibrils, the chromatin masses described lying upon and being in connection with the network. One could say that the fibres seem like delicate reticulate pseudopodia from the chromatin masses.

The fibres of chromatin are sometimes quite even (Fig. 46, Pl. XVIII); again one finds them considerably enlarged at the nodes (Fig. 27, Pl. XV); in other nuclei one sees them as rows of different sized granules strung on a thread (*cf.* Fig. 50, Pl. XVIII, a nucleus in mitosis). These differences cannot be wholly due to differences in staining, but represent real divergent conditions of the chromatin threads during the so-called resting stage. The chromatic structures of the nucleus never seem

[1]) *Cf.* Tönniges (1899), Boveri (1900).

to be arranged in the form of an alveolated foam, but are in the form of masses and fibrils. It is difficult with most dyes to distinguish the chromatic fibrils from the achromatic, but double staining with safranin and light green gives a very clear demonstration of the distinctness of the two sorts of fibrils, the chromatin being red, the linin green. Care must, however, be taken not to extract the light green too much. The slides must be left in absolute alcohol but a moment, else the light green may be extracted from the nucleus and the whole endoplasma as well, remaining only in the ectoplasma.

The chromatin masses are not homogeneous, but contain many granules which after staining with safranin (Fig. 31, Pl. XV) iron-haematoxylin (*O. caudata*, Figs. 83, 84, 86, Pl. XX), or DELAFIELD's haematoxylin (Fig. 69, Pl. XIX), decolorize more slowly than the rest of the chromatin mass. The character of these granules can best be discussed in connection with the later stages of mitosis.

In the preliminary notice of this work (METCALF 1907*a*) I wrote "The chromatin net in the 'resting' nucleus consists of large and small chromatin masses and their branching anastomosing pseudopodia-like processes. In certain conditions of the nucleus no such processes are found". After further study, it seems that the last statement is mistaken and that more or less of a network of chromatin is always present, though in some conditions of the nucleus it may be very delicate and difficult to distinguish from the achromatic foam even with differential stains.

Prophases of mitosis.

One sees from the study of total preparations and of sections that, as the nucleus prepares for mitosis, the longitudinal fibres of the chromatin net become emphasized and the transverse fibrils become fainter (Figs. 45—52, 57, Pl. XVIII). One imagines that the latter are drawn in and that their substance is added to the longitudinal fibres. At this time the nodes that lie along the longitudinal fibres are especially emphasized (Fig. 50). While the chromatic spindle is thus forming, the longitudinal films of the achromatic foam thicken and the transverse films become fainter (left side of Fig. 47, Pl. XVIII), the whole nucleus at the same time becoming elongated.

The spindle is never regular and is hardly well enough formed to be comparable to the spindle in the mitosis of metazoan cells. Figs. 49 to 52, Plate XVIII, show it in its fullest development. The thicker fibres in the whole nucleus are seen to have an irregularly

longitudinal direction, yet they are always connected by transverse fibrils (Fig. 50). The general form of the group of fibres is spindle-shaped, it being thickest at the equator of the nucleus, where it bulges ont almost or qnite to the nuclear membrane. As the chief chromatic fibres converge toward the two poles of the nucleus they frequently, one can say usually, bend inward toward the axis of the nucleus, presenting a peculiar and very characteristic appearance of a spindle with acuminate ends.

Centrosomes.

There are no centrosomes visible either inside or outside the nucleus.[1]) The thick chromatic fibres extend to and are in contact with the nuclear membrane at the poles of the nucleus (Figs. 51, 55. Pl. XVIII). Usually these fibres are somewhat swollen at or near their ends, forming granules of qnite noticeable size (Figs. 51, 57, Pl. XVIII). There are no special aggregations of achromatic material, either granular or fibrous, at the poles of the nuclens. None of the structures found can be interpreted as a centrosome.

Equatorial plate stage.

These is no well defined equatorial plate stage in the mitosis. The chromatin masses make an irregular group scattered through the whole equatorial third of the nucleus (Figs. 45—48, Pl. XVIII). There is at this time no indication of any longitndinal splitting of the chromosome masses. If it occurs at all, it has occurred previous to this stage.

Anaphases.

This very irregular and imperfect eqnatorial plate stage soon passes into an early anaphase condition in which one sees the chromatin masses arranged in two transverse rows (Figs. 49—52, Pl. XVIII). These masses are still united one to another by the longitudinal fibrils and one often finds this connection so definite as to suggest that the masses so united in pairs are products of a transverse division of the chromatin masses of an earlier stage. Probably some have recently divided, but others divide at a considerably earlier stage, before the spindle is formed. Some of the

[1]) *Cf.* Pfitzner (1886), Tönniges (1899), Léger & Duboscq (1904*b*) and Nereshelmer (1907).

masses of chromatin may be slower than the rest in coming to the center of the nucleus and in taking their place in this double transverse row, but in the end all do so.

Each chromatin mass is connected with the pole of the nucleus by one, or sometimes by two, of the thicker chromatin fibres (Fig. 50). The chromatin masses of the two groups are also connected with one another by thick fibres which cross the equator of the nucleus. Occasionally one sees a fibre start from a chromatin mass, cross the equator of the nucleus and pass on directly to the opposite pole without connecting on the way with a second chromatin mass (Fig. 50). This, however, is not very general. One may say that the chromatic spindle is composed of fibres which in general stretch from pole to pole of the nucleus and connect in their course with one or two chromatin masses. The fibres may branch and unite in a more or less irregular way.

The chromatin masses now begin to migrate toward the poles of the nucleus (Figs. 53—55, 58, Pl. XVIII). During these migration stages, one often sees that the chromatin fibres connecting the chromatin masses with the poles are thicker, while the fibres stretching across the equator are fainter (Fig. 54, Pl. XVIII; *O. caudata,* Fig. 81, Pl. XX). During this migration the chromosome masses assume more definite shape, becoming in general more elongated (Fig. 58). They lie side by side and because of their regular arrangement and compact form are best studied at this stage. They seem to be true chromosomes. They keep their regular parallel position during the whole migration, but, as thy approach the pole, first some and then others may divide into two (Fig. 54), and at about the same time they send out thin broad plates of chromatin which unite them together (*cf.* the upper end of the nucleus in Fig. 58). The stage, then, when the chromosomes can be counted and studied to best advantage, is but a brief one during the middle portion of the migration. As some chromosomes may be late in coming into the double transverse equatorial plate, and as others may divide precociously during the migration, one finds, in certain nuclei, conditions that are very confusing. I have, however, carefully counted the chromosomes in more than a hundred favorable nuclei in the middle anophase condition and find their number to be eight for *O. intestinalis* (Figs. 32, 33, 36, Pl. XVI; 58, Pl. XVIII; 65, Pl. XIX; 119, Pl. XXII, anterior nuclei of 201—203, Pl. XXIV). The apparent exceptions are due, I believe, wholly to precocious division of the chromosomes, or to their precocious fusion by means of the band-

shaped pseudopodia. In some dumbbell-shaped nuclei one sees, in one end, the chromosomes already thus fragmented or fused, while in the other end of the same nucleus the eight chromosomes are compact and distinct (Fig. 34, Pl. XVI; 63, Pl. XIX).

The chromosomes, even in their most compact condition, give off numerons threads which connect with the general chromatic network. Unless the staining is satisfactory the threads themselves are sometimes difficult to see, but one rarely fails to notice upon the surface of the chromosomes the pointed protrusions with which the threads connect.

The chromosomes differ in size and form and in the number of granules they contain. After much study I must confess that I am not sure whether these differences are constant. The granules are so small and, especially in this stage, so difficult to see, that the margin of error in the count in a single chromosome is greater than the difference betwen the numbers in different chromosomes. In the first attempts to count in different nuclei the granules in the chromosome which is the first to divide during the telophase, the numbers so nearly agreed as to give hope that evidence from this source would prove valuable, but further study has rendered the whole matter so doubtful that it is best to say nothing further of it. Similarly, after prolonged study of the form and size of the chromosomes, I feel that it would be unsafe to express an opinion as to the constancy of these characters. It is true that there is usually a remarkable degree of resemblance between the chromosomes of the two ends of the same nucleus in their size and form and in the time and manner of their division or fusion in the early telophase. It is also true that one finds nuclei in different animals whose chromosomes show equally remarkable resemblance in these regards. Yet the whole series of phenomena is so often confused by the early appearance of division or fusion in the telophase and the precocious appearance of the characteristic differences between the anterior and posterior nuclei, that is seems unsafe to conclude from the resemblance referred to that the chromosomes have constant and characteristic differences from one another. I incline to that belief, but cannot quite convince myself. It would be easy to give rather convincing drawings, if only the most favorable nuclei were selected, but the study of hundreds of nuclei shows the conditions to be too various for satisfactory solution of the question.

Telophases.

When the chromosomes have passed almost to the poles of the nucleus, they stop their migration and enter upon the changes of the telophase. These changes affect both the chromosomes themselves and the fibrillar portion of the chromatin, as well as the achromatic films. The chromatin fibres in the equatorial area are already, or soon become, more slender and more branched. The fibres nniting the chromosomes to the poles of the nucleus somewhat more tardily undergo the same change. The longitudinal films of the achromatic foam similarly become less emphasized until one sees no distinction between the longitudinal and transverse films. The nucleus has now wholly lost its longitudinally striated appearance.

Two sets of changes occur in the chromosomes, they constrict transversely, and they fuse. The transverse constriction of the chromosomes is very freqnently seen dnring the telophases (Figs. 53, 54, 58, Pl. XVIII). They do not all constrict transversely at this time for one never finds a nucleus in the condition which would thus resnlt. In many cases no transverse constriction occurs until later. In one of the chromosomes, the first to so constrict, the division is very unequal, the larger moiety lying toward the equator and the smaller toward the pole (Figs. 53,[1]) 54, Pl. XVIII). The two parts are generally clearly seen to be united by a distinct thread resembling one of the thick fibres of the chromatin spindle. Another of the chromosomes divides more nearly equally, the slightly smaller moiety being toward the pole of the nuclens. As already, said this transverse constriction of the chromosomes does not always occur before their fusion. One cannot say which is the proper and which the divergent time relation between these two sets of phenomena, transverse constriction and fusion.

The chromosomes nnite by sending out thin plates of chromatin which pass from one chromosome to the next (Figs. 58, Pl. XVIII; 60—63, Pl. XIX). At first perhaps bnt a single pair will nnite (Fig. 58), then others will become connected. There may thns arise a very irregular complete ring of chromatin just beneath the nuclear membrane[2]) (*cf. O. caudata*, Fig. 82, Pl. XX). This fusion may begin

[1]) This figure shows the only exception I have found to the rule that the smaller moiety of the chromosome first to constrict lies toward the pole. In the posterior end of the anterior nucleus the smaller moiety of the divided chromosome is nearer the equator.

[2]) Léger & Duboscq's Fig. 19 is interesting in this connection (*cf.* Text Fig. IV H, page 249).

during the early telophases, before the elongated nucleus has become dumbbell-shaped (Fig. 58), or may not have occurred by the time the daughter nuclei are quite distinct (Fig. 65, Pl. XIX).

Spireme.

Ultimatly a condition is reached in which the chromosomes are completely united to form a long ribbon coiled irregularly over the surface of the nucleus, beneath the nuclear membrane (Fig. 34, lower half, Pl. XVI; 67, Pl. XIX). Along the course of this ribbon, from very many points, threads run out to join the chromatin network. In the preliminary notice of this paper (Metcalf, 1907 *a*). I referred to the chromatin ribbon as a more or less compact mass. The more compact condition is found in animals which have been kept for a time in cultures, and is probably slightly abnormal.

Resting nucleus.

Later the ribbon breaks up into band-shaped portions of unequal size, varying in number from six to sixteen (Figs. 68, 70, Pl. XIX; 76—79, Pl. XX). Either at first, or at some time before the next division of the nucleus, the chromatin masses become sixteen in number (Figs. 35, 37, Pl. XVI), for we find sixteen of them, arranged in two rows of eight each during the next anaphase, as described (Fig. 36, Pl. XVI). Often, in nuclei in which the spindle is beginning to form, sixteen chromatin masses (chromosomes) can be counted (Fig. 35). In other similar nuclei fewer chromatin masses are found, the division of some of them evidently being retarded (Figs. 46—48, Pl. XVIII).

The constriction of the nucleus into two daughter nuclei connected by a thread occurs before the complete fusion of the chromosomes into a ribbon. By the time this ribbon has broken into its smaller portions the two nuclei are far separated in the cell, being connected only by a very slender thread consisting of the attenuated nuclear membrane.

After the separation of the chromatin ribbon into its several portions, the spindle for the next division begins to form as already described.

The nuclear membrane has remained intact during this whole mitotic cycle.

Division of the body.

The divisiou of the body begins while the two parent nuclei are in a late anaphase of mitosis (Fig. 38, Pl. XVII), and the separation of the daughter cells, in normal vigorous animals, is complete during the latest anaphase (Fig. 43), or less often during the early telophase, when the daughter nucleus is dumbell-shaped (Fig. 42). In division one daughter cell receives the anterior nucleus of the parent, the other daughter cell receives the posterior nucleus, both nuclei soon completing their division and becoming double. The division of the body, after it begins, occupies, in the fall and winter, about one day. As this begins and ends generally during the anaphases, it is evident that the whole mitotic cycle mnst occupy many days. Less vigorous animals, weakened by being kept too long in unnatural conditions outside the host, may take two or three days for division, or may even fail to complete the division.

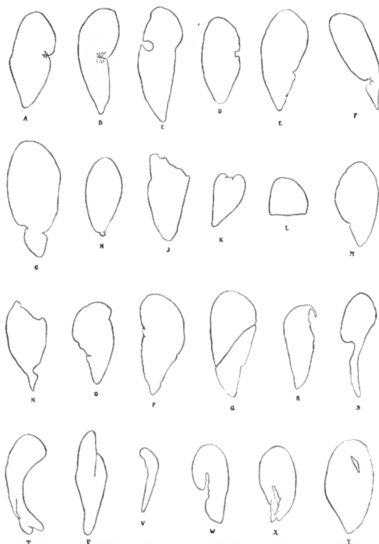
Occasionally one sees individnals fresh from division, one side of whose body is drawn out into irregular strands (Fig. 43, Pl. XVII). This appearance is explained when one observes the last stages of the division itself and finds the two daughter animals united by such strands that have been drawn out by the efforts of the animals to pull away from one another. Zeller described these conditions.

Division of the body in *O. indestinalis* is usually longitudinal. In one series of preparation of individuals which were probably slightly abnormal, only one of the two nnclei in each individnal having a nucleolus, I found that the conditions of the nucleolus gave a criterion enabling one to estimate the relative frequency of transverse division. In individuals resulting from transverse division, the posterior daughter cell, when its nuclens completed its division, showed the nucleolus in the posterior of its two nuclei; the anterior daughter cell, in a corresponding stage, showed the nucleolus in the anterior of its two nuclei. Only young anterior and posterior daughter cells can with certainty be distinguished by their form and general appearance. In these preparations of abnormal individuals the nucleolar relations were, without exception, as described, in the case of the young daughter cells, and doubtless held good for the older cells. In the case of longitudinal division of the body each daughter cell, when its nucleus divides, shows the uncleolus in the posterior nuclens. Eight per-cent of the individuals on these slides show the nncleolus in the anterior nucleus. We can therefore estimate that sixteeu per-cent of the divisions were transverse. Probably normal

individuals would show a similar proportion of transverse divisions. Figs. 44, Pl. XVII, and 20, Pl. XV show individuals in transverse division. Zeller describes and figures transverse divisions for *O. intestinalis*, but does not speak definitely as to their relative frequency, though implying that they are numerous.

In *O. caudata* transverse division is of the same character and about as frequent as in *O. intestinalis*. The longitudinal divisions are exactly similar in the two species. In *O. dimidiata* longitudinal division resembles that of the binucleated species, except that in this multinucleated form there is no apparent connection between nuclear division and the division of the body. I have not observed transverse division in this species, but Zeller's observations show clearly that it occurs. I have once seen longitudinal division of the body in *O. zelleri*: it resembled that of *O. dimidiata*. In *O. obtrigona* and *O. ranarum* one finds longitudinal, transverse and irregular divisions, the latter in the spring when division is very rapid (Text Fig. III). In all species the longitudinal divisions follow the main axis of the body. As this is bent, [1]) the really longitudinal divisions, especially in the flattened species, appear to be oblique, as Zeller has described them. Cohn (1904) and Schouteden (1905) have shown that the so-called oblique division of *O. ranarum* is morphologically longitudinal. I have studied *O. ranarum* but little, but from observation of *O. obtrigona* I doubt if the longitudinal and transverse divisions are so definite in their sequence as Zeller describes them. Reference to the figures of irregular division in *O. obtrigona* (Text Fig. III) shows that in the spring one may find almost any sort of irregularily, even two or three entirely irregular

[1]) *Ciliata* and *Flagellata* have either the body form asymmetrical, or the organs of locomotion asymmetrically arranged, or both, so that the animals rotate on their main axes as they swim, producing spiral progression, *Opalina* is no exception to this rule. The spiral motion in *Opalina* is caused by two factors, first by the bend in the anterior end of the body, second by the spiral arrangement of the rows of cilia. The latter is not a result of the former, for, if one should straighten out the bend in the body of an *Opalina*, the rows of cilia would still be spiral. Dale (1901), Wallengren (1903), quoted by Jennings (1906), emphasize also the direction of the beat of the individual cilia in *O. ranarum* in producing spiral progression, rows of cilia along the right side of the anterior end being said to beat forward and to the left, while the others beat backward (Text Fig. XVI, page 335). It seems to me these authors have failed to emphasize that the broad anterior end of the body in this species is bent "to the right" as is so evident in other more slender species, so that the morphological anterior end is not the actual anterior end. The cilia in all species seem to beat nearly if not quite in the morphologically posterior direction.



Text Fig. III. Outline drawings of *O. obtrigona* showing the irregular divisions in the spring, previous to the formation of the infection cysts. In each figure the anterior end is uppermost. Transverse division *A—H* and *M—P*. Oblique division *Q*. Longitudinal division beginning as a perforation of the central part of the body *Y*. Longitudinal division beginning at the posterior end of the body *X*. Three divisions occurring at the same time *O*, *Q*.

divisions occurring at once (*Q*). Sometimes the division furrow begins in the middle of the body, instead of at the edge, and spreads to the edge (*Y*). Tönniges (1899) has described exactly parallel phenomena in the irregnlar divisions of *O. ranarum* in the spring.

Were the divisions of the body always as regnlar as Zeller describes, one would be tempted to compare them with the regular divisions of an egg, in which each division plane has a definite and predictable direction. Vegetative division in most *Ciliata* is transverse; in the *Flagellata* it is longitndinal; in *Opalina* it is generally longitudinal, sometimes transverse, and, in the multinncleated flattened species, sometimes irregularly oblique.

Time of appearance of the new nucleolus.

We have already seen that the nncleolus in the parent nucleus does not divide, but remains in one of the daughter nnclei, the other daughter nncleus acqniring a new nucleolus. This new nucleolus appears near the pointed end of the nuclens, where it narrows to the thread which connects it with its sister nucleus (Fig. 72, Pl. XIX). The new nucleolns does not appear in the danghter nncleus until the chromatin ribbon is ready to break up, or has already broken np, into separate chromatin masses. It increases and is of full size by the time the new spindle for the next division begins to form.

Differences between the two nuclei.

Very often the two nnclei are not in exactly the same stage of mitosis. Frequently one half of the dividing nucleus will have its chromosomes all distinct, while the other half shows them beginning to unite by means of band-shaped psendopodia (Fig. 58, Pl. XVIII; 34, Pl. XVI); or one nucleus may show a complete chromatin ribbon while the other has its chromatin ribbon already broken into a number of pieces (*cf.* Fig. 37, Pl. XVI, in which one nucleus shows fourteen (?) chromatin masses, while the chromatin ribbon of the other nucleus has not yet completely divided). In very many cases in nuclei which are forming and casting off the chromatin spherules, soon to be described, one sees these spherules larger in one nucleus than in the other, or already separated from the chromatin masses in one nucleus but not in the other. In abnormal nuclei of animals kept too long ontside the host, there are often differences between the two nuclei (Fig. 95, Pl. XXI). Gener-

ally, but by no means always, it is the anterior nucleus, in *O. intestinalis*, which is in the more advanced condition of the two, if they be different, although in this nucleus the restoration of fully typical structure after mitosis is somewhat delayed because of the late appearance of the new nucleolus. One would naturally expect the chromatin of this nucleus to be in the less advanced condition of the two, if there is to be a difference.

Chromatin spherules.

In this description of mitosis no reference has been made to one of the most interesting series of phenomena, i. e. the diminution of the chromatin by the throwing off and dissolving of a large proportion of the material of the chromatin masses into which the chromatin ribbon constricts as described.

Mention has been made of the granules present in the chromosomes at all times. These are small, usually no larger than the achromatic granules of the nucleus. In addition to these, in *O. intestinalis*, many larger spherical granules appear during the late spireme stage, or as soon as the chromatin ribbon is broken into separate masses (Figs. 71—73, Pl. XIX; 21, 22, 28–31, Pl. XV). These spherules[1]) are formed at the surface of the chromatin masses and protrude beyond their contour. They are of different sizes, not only in the same nucleus, but upon the same chromatin mass. They are compact and seem homogeneous with all stains used. Before the spindle for the next mitosis forms, the chromatin spherules break away from the now divided chromatin ribbon and come to lie free in the nucleus (Fig. 72, Pl. XIX). At first they stain very strongly, bnt, by the time the spindle for the next mitosis is formed, they stain much more faintly (Fig. 75, Pl. XX, also Figs. 23, Pl. XV; 65, Pl. XIX; 79, Pl. XX). By the time the anaphase stage is reached they usually can no longer be recognised, though occasionally they can be faintly discerned even in the early telophases.[2])

The formation of chromatin spherules was not seen in the gametes or zygotes or in the gamete mother-cells. I did not

[1]) In the preliminary notice of this paper I called these structures sometimes spherules and sometimes spheres. It seeme best to call them chromatin spherules and to reserve the term chromatin spheres for certain much larger bodies formed in and extruded from the nuclei in the spring before the sexual phenomena occur.

[2]) Fig. 94, Pl. XXI, shows a pair of abnormal nuclei in the anterior of which are granular bodies which may be dissolving chromatin spherules.

observe the chromatin spherules in the early part of my stndy of *Opalina* in the fall and early winter.[1]) They were abundant in the late winter and early spring. I have since fonnd them in material preserved in the fall. As I have not yet studied material from tadpoles preserved in the summer, I cannot say for how long a period their formation is interrupted, though it seems probable that they are absent from the nuclei which have cast off their vegetative chromatin (a process to be described later) and in which the ordinary proportions of vegetative and reproductive chromatin, characteristic of the vegetative phase of the life cycle, have not been restored by subseqnent growth.

Their fate is a little donbtful. They seem to go into solution. It is apparently these chromatin spherules which Conte & Vaney (1902) have described as passing through the nuclear membrane into the cell-body and there giving rise by division to the refractive sphernles in the cytoplasm. It seems as if they do occasionally pass undissolved through the ends of the nucleus at the place where the nnclear membrane broke in a former division. In several dozen instances I have found the end of a nucleus drawn out into an irregular protrusion and one (rarely more) body resembling a chromatin spherule lying in this protrnsion, apparently ready to pass out into the cell-body (Figs. 78—80, Pl. XX). In some instances the membrane bounding the protrusion is noticeably more delicate than that of the rest of the nucleus. The chromatin spherules in these protrusions generally stain but faintly, having already somewhat changed their character. On the other hand there were several times seen, in these protrusions from the nncleus, spherules which with iron-haematoxylin were deeply stained. Fig. 5, Pl. XIV, shows one such nucleus. The slide was well decolorized and the endoplasmic spherules are quite light colored, only their granules being dark. Even the chromosomes are lighter than usnal, but the chromatin spherule in the nuclear protrusion, and two other spherules at the base of the protrusion, are heavily stained. Apparently they stain almost as strongly as if newly formed, thongh this nucleus is in a late anaphase. Their persistence in this condition to so late a stage in very exceptional.

There are from twenty to one hundred or more, of the chromatin spherules in oue nucleus (*cf.* Pl. XV: Figs. 21 aud 22 show one nucleus, Figs. 28—31 another). If they all passed uudissolved throngh

[1]) Because my attention was not then directed to them.

the nuclear membrane, one would surely see more frequent evidence of their doing so. It seems certain that only a very small proportion, if any, pass as solid bodies out of the nucleus. In the great majority of nuclei apparently none do so.

It seems, however, not improbable that the chromatin spherules of the nucleus and the endoplasmic spherules may be somewhat related. Their staining reactions suggest this. Stained with DELAFIELD's haematoxylin the newly formed chromatin spherules are very dark blue; the older chromatin spherules stain less and less, and finally are not stained at all. The endosarc spherules are entirely unstained with this reagent. Similarly with safranin and light green the chromatin spherules, if newly formed, stain deep red; older chromatin spherules stain more faintly, and in nuclei in which the new spindle has appeared they are either very faint or have already disappeared. With the same dye the endoplasmic spherules are colored a very faint pink, resembling the almost dissolved chromatin spherules within the nucleus. As the chromatin spherules loose their staining capacity one sees that many are growing smaller; some, on the other hand, in the same nuclei often seem to be enlarged and more diffuse. Not infrequently one finds faintly staining irregular masses which look like dissolved chromatin spherules filling several alveoli of the nuclear foam, and I believe this is the proper interpretation (*cf.* Fig. 58, Pl. XVIII, in which near the centre of the nucleus are such faintly stained areas). Is seems well-nigh certain that the chromatin spherules dissolve, and it is probable that they pass in liquid form through the nuclear membrane into the cytoplasm. It is not improbable that, having reached the cytoplasm, this material reforms in the endoplasmic spherules. Very likely, however, material from the cytoplasm as well is used in the formation of the cytoplasmic spherules.

The origin of the endoplasmic spherules from the chromatin spherules is by no means assured. The granules that with proper staining are always seen in the endoplasmic spherules, and especially the lines occasionally seen within them, connecting their granules, suggest that they are formed elements of considerable complexity. If they really divided, as TÖNNIGES (1898) and KUNSTLER & GINESTE (1905) describe, their interpretation as living constituents of the cell would seem unavoidable. I do not, however, find evidence of their division, the constricted portions of the frequent dumbbell-shaped spherules never being very slender as if about to part.

If the two sorts of spherules be related as suggested, probably the material from one chromatin spherule is enough to form or aid

in the formation of many endoplasmic spherules; otherwise it would be difficult to explain the great number of the latter present in the body at all times. The whole body divides during each mitosis, so that the number of endoplasmic spherules is redneed to half. The chromatin spherules are formed during each mitotic cycle, but there are rarely, if ever, more than one hundred and twenty in one nuclens, while there are many hundreds of the endoplasmic spherules in an ordinary sized *Opalina intestinalis*. Kunstler & Gineste estimate eight thousand for an ordinary sized *O. dimidiata*, a much larger species than *O. intestinalis* and having many more endoplasmic spherules. If the endoplasmic spherules are in any way derived from the chromatin spherules, and if they do not increase by division there seems no escape from the conclusion that the material of one chromatin spherule suffices for many endoplasmic spherules. The endoplasmic spherules are larger than the chromatin spherules. New chromatin spherules do not continue to form in the nucleus while the earlier formed ones are dissolving, for one does not find them showing all varieties of staining in the same nucleus. They stain all about alike. The period during which the chromatin spherules form is indeed a rather brief one, extending from the end of the spireme (chromatin ribbon) stage to the beginning of the formation of the spindle.

It is, of course, possible that the chromatin spherules are but by products of the metabolism of the chromosomes and that they have little significance. Yet their staining reactions, with all stains used, seem to indicate that they are composed of chromatin, and the gradations in their staining, as they dissolve, seem to connect them with the refractive spherules of the endosarc.

In *O. caudata* the condition of the chromatin spherules and endoplasmic spherules is like that in *O. intestinalis*. The multinucleated species, *O. dimidiata*, *O. zelleri*, *O. ranarum* and *O. obtrigona*, have endoplasmic spherules of the same character. Their nuclei are so small that it is not easy to study in them the formation of the chromatin spherules, and I have not attempted it.

Origin of the ectosarc spherules.

I have seen nothing to indicate any genetic connection between the spherules of the endosarc and those of the ectosarc, except that with iron-haematoxylin, when very thoroughly extracted, one sometimes finds, in the ectosarc, spherules showing an internally granular

and fibrous appearance exactly similar to that seen in the endosarc spherules. I am somewhat puzzled by this observation. Under all other conditions the two sorts of spherules seem very distinct. To most stains they react in an utterly different way (cf. the table in the appendix). It is difficult to belive that the bodies in the ectosarc, which with iron-haematoxylin show this structure, are really the ordinary ectosarc spherules. They are not endosarc spherules which have been misplaced by the microtome knife, and they cannot be endosarc spherules which have wandered unmodified into the ectosarc, for in sections stained with differential stains one never sees endosarc spherules in the ectosarc. These conditions sometimes seen in sections stained with iron-haematoxylin are not enough to indicate that the ectosarc spherules arise from the endosarc spherules. They are far more probably formed in situ.

Splitting of the chromosomes.

Pfitzner (1886) is the only student who has described splitting of the chromosomes in *Opalina*, and all more recent workers agree that he was mistaken in his description. The chromosomes do not form into a definite equatorial plate and then split, as he described for *O. ranarum*. I find no convincing evidence of splitting of the chromosomes at any stage of the mitosis, but in sections of *O. intestinalis* and *O. caudata*, stained with iron-haematoxylin, one often sees, in the early telophases, a condition that suggests that the chromosomes may possibly be splitting (Fig. 86, Pl. XX). The chromosomes, when seen in side view, have a lighter axis and darker edges. Close observation shows that the darker appearance of the edges is due to the presence there of deeply staining granules which are absent from the axis of the chromosome. It would seem very simple to find cross sections of chromosomes in this condition and to determine definitely if we do have here a true splitting involving a division of the granules, but, so far, I have failed to obtain convincing pictures.

Léger & Duboscq (1904*b*) describe for *O. saturnalis* the formation of an equatorial ring and its division which they interpret as equivalent to the ordinary splitting of the chromosomes (Text Fig. IV, *B, C, D*). To this we will return.

Nuclear conditions in other species compared with those in O. intestinalis.

The nuclear conditions in *O. caudata* are so similar to those in *O. intestinalis* that but one point needs mention, namely, that the

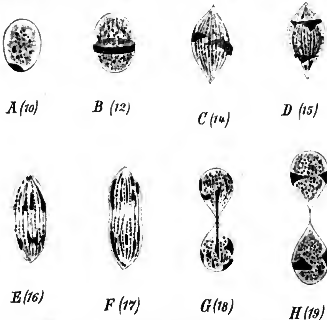
nnmber of the chromosomes is six instead of eight (Fig. 81, 82, Pl. XX). In the multinucleated species the nuclei are much smaller and less favorahle for study and I have given them much less attention. The nuclear memhrane persists through the whole mitosis; there are no indications of centrosomes; the spindle is similar to that of *O. intestinalis*; the chromatin lies just beneath the nuclear membrane.

The nnmber of the chromosomes in *O. ranarum* and *O. dimidiata*, as Neresheimer has said, seems to be twelve. The nucleus of *O. dimidiata* shown in Fig. 17, Pl. XIV, is unusually clear, bring surrounded hy vacnoles of the excretory organ, and in this instance there seems little doubt that there are twelve rows of snperficial granules, each row prohahly corresponding to a chromosome. The chromosomes in these multinncleated forms are more grannlar and less compact than in the hinucleated species. The relations of the chromatin spherules are difficult to make out. The resting nnclei show a very characteristic appearance with a superficial chromatin network with enlarged nodes, and one to four disc-shaped chromatin masses closely applied to the nuclear membrane (Figs. 99—101. Pl. XXI; Text Fig. X, *a* and *b*). I have not yet attempted to follow the course of the mitosis, nor have I studied the nucleolus carefully. The chromosomes in multinncleated *Opalinae* seem to be more granular and less compact than those in *O. intestinalis* and *O. caudata*. They often appear merely as rows of granules. The chromosomes of *O. caudata* and *O. intestinalis* are always grannlar as descrihed, but the granules instead of being in linear aggregates are scattered through a mass of less darkly staining chromatin, this mass with its grannles composing the chromosome.

Léger & Duboscq (1904 *b*) have described mitosis in *O. saturnalis* in a way that is somewhat difficult to reconcile with my description of the phenomena in *O. intestinalis* and *O. caudata*. Text Fig. IV shows eight of their figures: *A* is a resting nucleus; *B* shows the characteristic gathering of a part of the chromatin into an interrupted band around the equator of the nucleus; in *C* this band is shown dividing; in *D* the two parts are seen migrating toward the poles of the nucleus; *E* and *F* show how the daughter bands break into nnmerous parts which join the lines of granules ("chromosomes") and move with them to the poles; *G* and *H* show telophase stages in the reconstitution of the daughter nuclei.

Léger & Duboscq suggest that the divisiou of the equatorial band of chromatin is equivalent to the ordinary splitting of the chromo-

somes in metazoan nuclei. It seems more probable that the equatorial chromatin ring in *O. saturnalis* is comparable to a chromatin nucleolus. It seems impossible that its division can be equivalent to the splitting of the chromosomes in *Metazoa.* I have not yet examined nuclei of *O. saturnalis* and cannot interpret the nuclear conditions in this species in comparison with those described for *O. intestinalis* and *O. caudata.* It may be that the equatorial band

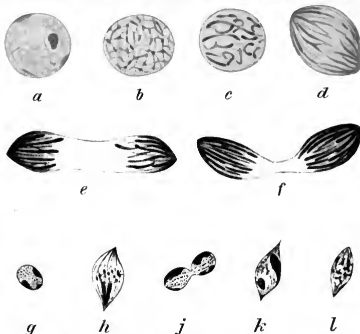


Text Fig. IV. Mitosis in *O. saturnalis.* After Léger & Duboscq. The numbers in parentheses are their figure numbers. × 1500 diameters.

of chromatin in *O. saturnalis* is homologons with the irregular ring of chromatin in daughter nuclei of *O. intestinalis* and *O. caudata* formed by the fusion of the chromosomes, as described, preceeding the formation of the chromatin ribbon (spireme). In multinucleated species and in *O. macronucleata* (Bezzenberger 1904) much of the chromatin often gathers in one or more large masses beneath the nuclear membrane (Figs. 99—101, Pl. XXI, and Text Fig. V, *a*). It is possible that these superficial chromatin masses correspond to the equatorial band in *O. saturnalis.*

Bezzenberger has described for the binucleated *O. macronucleata*

a type of mitosis that resembles that of the multinucleated species much more than that of *O. intestinalis* and *O. caudata* (Text Fig. V, *a—f*). The resting nucleus is like that of the multinuclear species; the chromosomes are numerous and are linear. In his Text Fig. XV (my Text Fig. V), *a* shows superficial chromatin masses like those in



Text Fig. V. Bezzenberger's figures of mitosis. *a—f* in *O. macronucleata*; *g—l* in *O. lanceolata*: *a* resting nucleus; *b—f* stages in division: *a—f* × 2000 diameters; *g—l* × 350 diameters.

a resting nucleus of *O. ranarum*; *b* shows the chromatin net without such larger masses; *c* is a spireme stage with the chromatin thread apparently ready to fragment to form the many chromosomes; *d*, *e* and *f* show anaphases. Bezzenberger gives also five figures of nuclei of *O. lanceolata*, whose mitosis seems to resemble somewhat that of *O. saturnalis* (Text Fig. V, *g—l*).

Enlarged individuals of *Opalina caudata* and of other species.

In both species of *Bombinator* one finds frequently, especially in the spring, certain very thick individuals of *O. caudata* (Fig. 88,

Pl. XX). These are generally associated with other normal forms, bnt rarely may be the only sort present in the rectum. I have never seen these very large individnals in division. That they are not a distinct species bnt are really *Opalinae caudatae* is proven by nnmerous transitional stages between the two forms. The chromatin in their nuclei is often, through not always, aggregated into larger masses than is the case in normal nuclei of ordinary forms, and one suspects that the animals are not entirely normal, yet they are as active as other forms and are freqnently fonnd in large numbers in freshly taken material.

It is chiefly the finding of these broad individuals of *O. caudata* that makes one a little donbtful as to the status of *O. zelleri* as a trne species rather than as a condition of *O. dimidiata.* I have never seen similar enlarged forms of *O. intestinalis* or *O. obtrigona.* In one lot of *O. ranarum* from the rectum of an apparently normal *Rana temporaria,* there were, among a large number of ordinary forms, a few (abont ten) individuals which were very much thicker than usual, being almost cylindrical. Their length was twice their width and their width half again as great as their thickness. I have not sectioned these thick individnals, but stained total preparations show nothing nnnsual in their appearance except the unnsual thickness of the endosarc, the nuclei being a little less closely set in the endosarc than in individuals of ordinary thickness.

Léger & Duboscq (1904 *b*) describe certain individnals of *O. saturnalis* as very broad and thick in comparison with their length. In these individuals the increased thickness is due to the greatly increased thickness of the ectosarc, in which the alveoles and spherules are of remarkable size. In *O. caudata* and *O. zelleri* and in the few thick individnals of *O. ranarum* seen, the increased thickness of the body is dne to the nnusual development of the endosarc. Léger & Duboscq suspected that the broad individuals of *O. saturnalis* might be prodncts of transverse division, bnt it is difficult to see what suggests this interpretation.

It is well known (Zeller 1877, Neresheimer 1907) that in the spring, when division becomes very rapid and most of the *Opalinae* become very small, some individnals in all species remain almost of full size, apparently not dividing any more rapidly than dnring the rest of the year. These large individuals do not encyst, but remain in the host and secure a continnance of its infection. It is possible that the great enlargement of some individnals is related in some way to the retardation of division. It is possible that

O. zelleri may be but a similar enlarged form of *O. dimidiata*. I have found *O. zelleri* only twice and then in the spring, and the thick forms of *O. caudata* are rather rare, except in the spring at a time when many individuals have already become small through repeated division. Both Zeller and I have found *O. zelleri* and *O. dimidiata* together in the same individual host. Neresheimer describes these two species as from *Rana esculenta*, but does not say if both occur in the same individual host. In no other instance, except one very doubtful one in *Bombinator*, have I ever found two species of *Opalina* in one rectum. Bezzenberger describes *O. lata* and *O. longa* as occurring in *Rana limnocharis*, but does not say if the two species are found together parasitic in the same individual. It seems to be very unusual to find two species of *Opalina* together in the same host. The presence of individuals of *O. dimidiata* with those of *O. zelleri* in the same host casts some doubt upon the status of *O. zelleri* as an independent species. Until, however, we have more evidence of its connection with *O. dimidiata*, we must, as Neresheimer has done, treat it as independent. Zeller, the discoverer of this form, expressed doubt as to its connection with *O. dimidiata*.

The chromatin spherules which are formed and dissolved, or extruded from the nuclei, during the course of each mitosis, seem to be especially connected with nutrition and growth. It is not impossible that careful study of the chromatin spherules in these large individuals of *O. caudata* and *O. ranarum* and in *O. zelleri*, might throw some light on their origin, but as yet I have found nothing of special import in this direction. I have not enough preparations of nuclei of any of these thick forms, in the right stage of mitosis, to allow me to study the point with sufficient care.

General considerations in connection with the structure of Opalina and of the phenomena of mitosis.

Ectosarc and endosarc.

The ectosarc and endosarc of *Opalina* are quite sharply distinct, both the protoplasmic granules and films and the refractive spherules of the two regions staining very differently with many stains. It is difficult to suggest to what this may be due. Is the primary

difference in the spherules or in the protoplasm itself? If the refractive spherules are products of the cytoplasm then, of course the primary difference between the ectosarc and endosarc must lie in the protoplasm itself. It seems, however not unlikely that the endosarc spherules are derived in part at least from the chromatin of the nucleus. On the other hand, the spherules of the ectosarc probably are formed by the ectoplasma itself. In *O. obtrigona* a few of the smaller spherules in the ectosarc are merely endosarc spherules that have wandered toward the periphery (Fig. 6, Pl. XIV). In other species studied, the endosarc spherules seldom, if ever, leave the endosarc. Even in *O. obtrigona* the migrated endosarc spherules lie in endosarc-like tissue which has protruded in strands between the alveoles of the ectosarc. In any case one can ignore these displaced endosarc spherules in inquiring as to the differences between endosarc and ectosarc.

That the peculiar staining reactions of the ectosarc are probably not due to the presence of the ectosarc spherules is shown by the fact that in the anterior end of the body, where only a few very small ectosarc spherules are present (Fig. 1), the ectosarc stain is just as divergent from that of the endosarc as it is in the rest of the body. That the difference in staining is not due to the absence of endosarc spherules from the ectosarc is shown by the fact that in *O. obtrigona* the ectosarc shows the same peculiar staining reactions as in other species, although in this species the endosarc spherules migrate into the ectosarc between the large alveoles, even reaching the sub-pellicular layer.

Apparently we can safely emphasize two points, first that there is very decided structural difference between the two regions, and second that there is an equally marked chemical and physiological difference, as indicated in the staining reactions and by the divergent character of the refractive spherules of the respective regions.[1])

One might suspect that the ectosarc spherules are excretory and that one of the chief functions of the ectoplasm itself is excretion, were there not present in the body, in several species, such a well developed system of excretory vacuoles. As these vacuoles lie in the endosarc and have no discernable connection with the ectosarc, we seem debarred from attributing any special excretory function to the ectosarc. We must rest for the present with the mere statement

[1]) Schubotz (1908) finds, in *Pycnothrix monocystoides*, that when stained by van Gieson's method the ectosarc is yellow, the endosarc red.

of the fact of a chemical and physiological difference between the ectosarc and endosarc, leaving unexplained the nature of this difference.

Excretory organs.

The special connection of the excretory organs with the nuclei is worth emphasis, though just what its physiological meaning may be is unexplained.

It is also of interest that the granules massed in the posterior end of the system of excretory vacuoles, which are from time to time extruded from the body, seem to be derived from granules of the cytoplasm, as indicated by their size and their exact resemblance to the granules of the cytoplasm bounding the posterior vacuole of the excretory system. In the processes of excretion certain of the cytoplasmic granules seem to be thrown away bodily.

The very primitive character of the excretory organs in *Opalina* has been emphasized in a previsious paper (Metcalf 1907 *c*).

Anterior end of the body.

The divergent character of the anterior end of the body also deserves special note. One sees that in this region the granules of the endosarc are more numerous, and the endosarc spherules much more abundant (Fig. 1), while in the ectosarc the very large alveoli and the large ectosarc spherules are wanting. As division of the body is constantly going on, growth must be constant, and one naturally thinks that the denser character of the anterior end may be related to special activity in this growth, yet this is not easy to prove. There are no definite points in the body which can be taken as landmarks in estimating the relative growth of different regions. The nuclei move within the plasma and so cannot be used as a fixed point for reference in studying the relative growth of different regions. That they so move is shown by the fact that one daughter cell, in each division, receives the posterior nucleus from the parent and that in a short time this comes to lie as near, or almost as near, to the anterior end of the body as does the nucleus in the other daughter cell (Pl. XVII).

Absence of centrosomes.

The absence of centrosomes in the mitosis is of interest. Centrosomes are well known among the *Protozoa* (e. g. in the *Sporozoa*). Among *Flagellata* and *Foraminifera* and in certain *Ciliata*, structures

which seem clearly to be related to true centrosomes are fonnd both inside and ontside the nuclei. The absence of centrosomes in *Opalina* is apparently not a primitive character.

In so for as the function of the centrosome is a mechanical one, furnishing a point of resistence in the movements attending mitosis, it is not needed in the mitosis of *Opalina*, for the ends of the spindle are attached to the nuclear membrane and this membrane can furnish the necessary resistence points, if any such be really needed. At each constriction of a nuclens in division, both the chromatic and the achromatic fibrils at the equator of the nucleus are pinched and held by the constricted nuclear membrane, and apparently the attachment of at least the chromatic fibrils to each end of the nuclear membrane persists even during the resting stage.

The spindle.

The mitotic spindle in *Opalina* is interesting in its simplicity, being formed merely by the enlarging of those fibrils and films which run lengthwise in the oval nucleus and by the concomitant diminishing in size of the transverse fibrils and films, the latter, apparently, for the most part, being drawn in like pseudopodia. There is nothing that can be interpreted as an outgrowth of fibres from any formative center, as seems to occur in connection with the centrosomes in many mitoses.[1])

The mitotic spindle in *Opalina* is also interesting in the fact that it is formed from both chromatic and achromatic material. In the resting nucleus the achromatic foam fills the whole nuclens, a network of chromatin fibrils being also present over the snrface of the nucleus jnst beneath the nuclear membrane. The appearance of longitudinal striation in the dividing nucleus is due to the emphasizing of the longitudinal strands of the chromatin net and the longitudinal films of the achromatic foam. The spindle, therefore, is composed of a central achromatic portion and a superficial chromatic portion. To what extent the two are connected in either the resting or dividing nuclei it is difficult to say.[2])

There seems to be little true resemblance between the condition in *Opalina*, with an outer spindle composed of chromatin and au inner spindle of achromatic substance, and the condition in many

[1]) Very similar conditions have been described by Boveri (1887 *b*, p. 21) in the formation of the spindle in the maturation divisions of *Ascaris megalocephala*.

[2]) Wilson (1895, 1:00) believes that the linin which gives rise to the mitotic spindle in sea-urchin eggs arises from the chromatin.

metazoan mitoses in which one distinguishes a central and an outer portion in the achromatic spindle. It seems somewhat doubtful if the mitotic spindle in *Opalina* is really comparable at all to the mitotic spindle of a metazoan cell, though the presence of perfect spindles of nearly, if not exactly, the metazoan type in *Sporozoa*, and the occurrence in other *Protozoa* of spindles of intermediate character, seem to justify our regarding the structure in *Opalina* as a true, through very lowly developed, spindle. Its achromatic portion is evidently more nearly related to the inner than to the outer spindle of *Metazoa*, being as Boveri (1900) has shown, a "netrum".

The mechanism of mitosis.

The machanism of mitosis in *Opalina* seems as difficult, in some regards, to nnderstand as it is in other forms. One sees nothing in the cytoplasm which seems to be acting upon the nucleus. So far as one can judge, the nucleus is automatic in its movements, for even the separation of the danghter nnclei cannot be due to the pull of the cytoplasm as the body elongates, since the thread connecting the daughter nuclei is often long and coiled, indicating that it has itself been in rapid growth. The whole nucleus wanders forward in that daughter cell which receives the posterior nucleus of the parent, and some sort of contraction in the cytoplasm seems necessary to explain this migration, but the changes of form in the nucleus itself seem due to its own activity.

In the changes of shape and in the movements accompanying mitosis are certain portions of the nucleus active and others passive? Does the nuclear membrane elongate and become spindle-shaped because it is pnshed upon by the fibres of the spindle forming within, or is the nuclear membrane the active agent, itself elongating by growth at the same time that it serves to supply points of resistence to the pull of the spindle fibers? Do the chromosomes migrate of their own accord along the chromatin fibres of the spindle; or do the latter contract and pull the chromosomes towards the poles of the nucleus; or do those portions of the spindle-fibres between the chromosomes elongate and push the chromosomes apart? Are both the chromatic fibres and achromatic films in the spindle active, or is one set of structures active and the other passive? A little evidence upon some of these points can be found.

The change in form of the nucleus from oval to elongated eliptical or spindle-shaped seems to be due to growth of the nuclear

membrane. The spindle usually does not fill the whole nucleus, the nuclear membrane apparently growing more rapidly than the rest of the nuclear structures. During the whole mitotic cycle the nuclei are in constant growth, as is indicated by their increase in size. That the nnclear membraue shares in this active growth is shown not only by the fact just mentioued that the spindle does not fill the nucleus, but also by the fact that in the late telophases the thread connecting the two daughter nuclei grows even to nnnecessary length and becomes coiled.

The usual peculiar form of the spindle, with acuminate ends, is instructive. It does not seem as if the chromatin fibres uniting the chromosomes to the poles of the nnclens can be contracting, for they are much, and quite irregularly, bent. They are not taut, as if pulling upon the chromosomes. Yet it is barely possible that the minute transverse fibrils counecting the longitudinal fibres of the spindle are drawing these together with sufficient force to bend them iuto the irregular bows which are seen. Naturally, at the narrowed ends of the nuclens, these transverse fibrils are more nnmerous iu a given area than they are near the equator, where the nucleus has nearly its original diameter. The first impressions one receives from such a nucleus as that shown in Figs. 49—52, Pl. XVIII, may be that the spindle is elongating and pushing the nuclear membrane iu front of it; yet the whole character of the chromatin fibres of the spindle is such as to suggest that they are pliable aud not so stiff as any such hypothesis of the force of their elongation wonld imply. The fibres are usually quite irregular and cnrved, and it seems impossible to think of their pushing with any appreciable force. Such irregular fibres may exert some pull, but that they can effectirely push is unbelievable.[1])

The migration of the chromosomes is accompanied by a perceptable thickening of the chromatin fibres connecting them to the poles of the nucleus, suggesting that the chromosomes are pulled toward the poles by the shortening of these fibres. As the chromosomes approach the pole they become less branched, less irregular in form and larger. On their way to the pole they seem to absorb most of the substance of the fibres of the chromatin spindle, drawing in the transverse strands of the chromatin net and taking up the substance of the longitudinal fibres aud adding it to their mass. Thus, during the late anaphase, a very large proportion of all the chromatin in

[1]) Prandtl (1905, 1906) believes that the equatorial portions of the spindle-fibres in *Didinium* elongate and push the chromosomes apart.

the nucleus is in the chromosomes. Soon the chromosomes begin again to send out processes and the chromatin network of the resting nucleus is formed. The whole migration of the chromosomes and the reformation of the chromatin network suggests comparison with the movements of a reticulate foraminiferan. All the chromatin seems to be active in this movement.

No explanation of the migration of the daughter chromosomes as dependant npon some repulsion between them, connected with their splitting, can apply here, for no such splitting occurs in the equatorial plate stage or immediately preceeding it. The splitting, if it occurs at all, is found in the telophases of mitosis, after, not before, the migratiou of the daughter chromosomes.

A chromosome cannot crawl upon nothing any more than can an animal. There must be some resistant snbstance npon which the moving chromosomes can advance. The resistant substratum in this case seems to be the alveolar achromatic material which fills the center of the nucleus, and whose alveoles with their delicate walls and contained liquid seem to furnish the necessary resistence for the movements of the chromosomes and their pseudopodia (chromatin fibrils). The attachment of the spindle fibres to the nuclear membrane also, of course, aids in these movements.

What causes the chromosomes to arrange themselves at first in the equatorial third of the nucleus and later to crawl to the poles of the nucleus, and what causes the changes in the form of the nucleus, are qnestions whose answer the conditions in *Opalina* do not help ns to approach.

Such a mitotic division as we see in *Opalina*, in which all parts of the nucleus seem to be active, membrane. chromatin and achromatin all sharing by active growth and movement, seems not only less specialized than the mitosis of higher forms, but also less removed. at least mechanically, from amitotic division, in which also probably all parts of the nucleus share by active movements. The presence of centrosomes in a cell allows the nnclear membrane and the chromatin and, in the most highly developed mitoses, the achromatic foam of the nucleus also, to be less active.

The polarity of the nuclei and the planes of division of the nuclei and of the body.

The nuclei of the binucleated *Opalinae* are always somewhat elongated, their two poles being always clearly recognisable. This

polarity is seen not only in the shape of the nucleus but also in the fact that the chromatin network is attached to each pole of the nucleus. This attachment is very clearly seen during mitosis and apparently persists through the "resting period". The orientation of the nuclei is constant and nnchanging, their long axis being about parallel with, usnally coincident with, the long axis of the body. The nuclei never rotate, except possibly upon their long axes, which would be without significance in this connection. This constancy of orientation may be due in part to the fact that the two nnclei are generally connected by a thread. The longitudinal axis of a daughter nucleus always remains in the same position as that of the parent nucleus. This enables us to clearly see the interesting fact that the nuclei of the binucleated species of *Opalina* always divide in the same direction and that they do so whether the accompanying division of the body is longitudinal or transverse.

In *Metazoa* and plant cells and in most *Protozoa* in which the relations are clearly discerned, the plane of division of the cell-body is parallel to the plane of division of the nncleus, both being perpendicular to the long axis of the mitotic spindle. The binncleated *Opalinae* show the same relation in the case of the unusual transverse divisions, but in the more frequent longitudinal divisions the plane of division of the body is parallel with the long axis of the nuclear spindle. A similar discrepancy between the directions of the division of the body and of the nncleus is seen in the Trypanosomes, but there the nuclear relations are not so clear, there being, especially, no certain indication that the orientation of the parent and daughter nuclei remains constant generation after generation. The constancy in the direction of the division of the nuclei and the variability in the direction of the division of the body in *Opalina* show that there is a lack of coordination between the direction of division of the nucleus and of the body. This lack of coordination is much more marked in the mnltinucleated species.

The conditions are interesting to consider from the point of view of phylogeny. If the anterior end of *Opalina* is homologons with the anterior end of a Flagellate, and doubtless it is so, we see that the two agree in dividing longitudinally. In most *Flagellata* we have only longitudinal divisions.[1]) Probably in *Opalina* the longitudinal division is primitive and the unusual transverse division secondary. The latter is probably comparable to the transverse division char-

[1]) *Oxyris marina* is said to divide transversely.

acteristic of the higher *Ciliata*. *Opalina* shows, therefore, a condition intermediate between that of *Flagellata* and that of the higher *Ciliata*, since, while retaining the more primitive type of division, it shows occasional divisions of the secondary type. The flattened multinucleated species of *Opalina* show more frequent transverse divisions than do the probably more primitive cylindrical binucleated species.

The phylogenetic significance of these phenomena is further considered on page 274 in connection with the discussion of the relationshipes of *Opalina* and the origin of distinct micro- and macronuclei in higher *Ciliata*.

Time relations in the division of the body and of the nucleus.

The two sets of daughter chromosomes in each nucleus of the binucleated *Opalinae* remain for one cell-generation in the same daughter cell, though soon separating into different nuclei; that is, division of the body lags one step behind the division of the nuclei. At the second division of the body the daughter chromosomes of the preceeding division become distributed to separate cells. Probably originally the binucleated condition was brought about by the delay of one division of the body, the temporary binucleated condition thus secured persisting until the body itself finally divides.[1] The multinucleated condition of other species seems due to the further suppression of other divisions of the body, nuclear division and division of the body in them being still more loosely related.

Splitting of the chromosomes.

In the mitosis of *Opalina* we do not find any longitudinal splitting of the chromosomes in connection with the imperfect equatorial plate stage. The chromosomes are then already present in nearly or fully the double number and, while one or two chromatin masses may constrict transversely during the equatorial plate stage, the majority merely rearrange themselves in two transverse rows preparatory to migration to the poles. Careful observation of the chromosomes in both ends of many nuclei during the anaphases shows that generally each chromosome in one end of the nucleus corre-

[1]) I find that Boveri (1900, p. 189) has similarly interpreted the binucleated condition of *Opalina* as due to delay in the division of the cell-body.

sponds more or less closely in size and form and in number of contained granules to one of the chromosomes at the other end. These corresponding chromosomes are opposite to one another. This all suggests very strongly that the daughter chromosomes in a dividing nncleus of *Opalina* are paired, just as truly as they are in a metazoan nncleus.

We have already seen in the early telophase a condition which suggests that the chromosomes may be splitting longitudinally. The fate of the two halves that may be so formed is well-nigh impossible to follow, for the chromosomes almost at once unite to form a continuous ribbon. I have never found sixteen chromosomes at each end or even at one end, of a nucleus in the telophase, nor have I seen evidence that the chromatin ribbon is donble. This, very interesting stage in the mitosis, needs further stndy, though I have little hope of obtaining conclnsive results. At present we can only say that splitting of the chromosomes does not occur at the equatorial plate stage, that it may occur in the telophases, and that in the anaphases the daughter chromosomes seem to be paired as in metazoan mitoses.

Gonder believes that splitting of the chromosomes may often occur during the anaphases or telophases of maturation mitoses, but I know of no description of other mitoses in which the splitting of the chromosomes occurs after their distribution to the daughter nnclei instead of in the eqnatorial plate or in the prophases.

If there be true splitting of the chromosomes in the telophase, one cannot be certain whether each granule in a chromosome divides (Fig. 86, Pl. XX). Some of the granules at the edges of the chromosome, seem spherical, others eliptical, others elongated rod-shaped, it is possible that adjacent granules often lie in contact, or even fuse, and so give an appearance of an elongated rod. In comparing the two rows of grannles at opposite edges of the apparently split chromosome, one sees a general resemblance but often the fusion or the contact of the granules in one line does not correspond exactly to that in the other line, and the two rows are not alike. Very likely, of course, even if the granules were all perfectly distinct, the two rows would not be found to be alike.

Of course, if, in general in mitosis, chromosomes retain their individuality during the spireme stage, is makes no real difference whether splitting of the chromosomes occurs before or during or after the spireme stage, so that mitosis in *Opalina* is not fundamentally different from that in most *Metazoa*, if splitting of the

chromosomes really occnrs during the telophases. If, on the other hand, the chromosomes and their contained granules do not divide into eqnivalent parts in each division of the nncleus, it seems that nuclear division in *Opalina* mnst be mnch simpler than mitotic division in higher forms.

I at first inclined toward the first hypothesis in interpreting the mitosis in *Opalina* and tried to imagine how these daugther chromosomes, formed in the telophase, could pass into the spireme and reappear later in the next double equatorial plate. Three salient facts are seen: 1) the fusion of the chromosomes in the late telophase is not a union end to end, bnt is instead an irregular lateral union, more or less broad plates of chromatin passing from the side of one chromosome to the side of the next, nntil they all become united to form the chromatin ribbon, 2) the chromosomes when they again become distinct, previous to the next mitosis, arise by transverse constriction of the chromatin ribbon and 3) the chromosomes remain permanentle, attached at each end to the poles of the nucleus by means of fibres some at least of which do not split. The transverse constriction of some of the chromosomes in the early telophases is a transient phenomenon, all the unconstricted chromosomes and the parts of the constricted chromosomes soon completely fusing in the spireme.

If the eight chromosomes split longitndinally in the telophase and then unite laterally to form the chromatin ribbon of the spireme stage, this ribbon might consist of the sixteen daughter chromosomes lying side by side in a single row. When now the spireme constricts transversely to form the sixteen chromosomes of the next mitosis, these might be the original sixteen daughter chromosomes from the longitudinal division in the last telophase. On the basis of such a schema, the relations of the grannles in the chromosomes would not be very difficult to bring into harmony with the usual conception of the chromosomes as consisting of a linear aggregate of chromioles which retain their individnality and which, in division, give one half of their substance to each daughter chromosome. But the chromosomes which in the telophase show appearance of splitting do not, as already noted, show their grannles arranged in pairs, so that we have, even on the basis of this schema, no satisfactory indication that equivalent daughter chromioles are distributed in the daughter chromosomes to each daughter nucleus: and furthermore, the attachment of each end of each parent chromosome to the corresponding pole of the nucleus by means of a per-

sistent fibre which, at least in some instances, does not itself split seems to introduce insuperable difficulty into the schema.

Calkins & Cull (1907) describe splitting of the chromosomes in the maturation divisions of *Paramaecium*, with a clearness which leaves no doubt that this type of mitosis occurs in at least some of its divisions, and so is known among the *Protozoa*.

Professor Boveri directed my attention to conditions in *Ascaris megalocephala* which seem similar to those in the telophases of mitosis in *Opalina* and which make it seem likely that the appearance of splitting in the chromosomes of *Opalina* during the telophases is not significant. In *Ascaris* the chromosomes are seen to be granular during the telophases, and the granules lie more or less distinctly in two rows at the edges of each chromosome, leaving the axes of the chromosomes lighter, as in *Opalina*. Van Beneden (1883, p. 343; 1887, Plate V, Fig. 8) has referred to these conditions in *Ascaris* as showing a second longitudinal division of the chromosomes in the telophases, one having already occurred in the equatorial plate stage of mitosis. Heidenhain, at the Anatomical Congress in Würzburg, 1907, described an appearance of splitting in the chromosomes in the telophases of mitosis in cells of the skin of salamanders. Boveri, during the discussion of Heidenhain's paper, suggested that, inasmuch as this appearence, when seen, is found in all parts of all the chromosomes, whatever their position may be, it cannot indicate a splitting of the chromosomes, but probably shows that the axes of the chromosomes in the cells of the salamander skin stain at this stage less deeply than the periphery. Chromosomes with unstained or faintly stained axes have since been interpreted by Haidenhain (1907) as having an axial linin fibril. The lighter axis of the chromosomes of *Opalina* during the telophases seems not to be due to the presence of an axial fibril of linin, but to the absence of granules at the axis and their presence at the edges of the chromosomes.

The appearance of granular edges and a lighter axis in the chromosomes of *Ascaris* is said by Boveri to be transient, disappearing when the chromosomes branch to form the network of the resting nucleus, and not showing in the chromosomes when these reappear from the resting nucleus preparatory to the next mitosis. There is no reason to believe that the splitting of the chromosomes in the new mitosis is a reappearance of a double condition in the previous telophase. The appearances of doubling of the chromosomes in the telophases seem quite similar in *Ascaris* and *Opalina*, and the condition in the cells of the salamander skin is somewhat

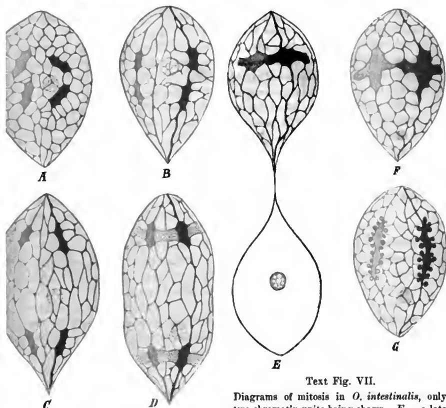
comparable. In *Ascaris* and the salamander the condition in the telophase seems to be unrelated to the true splitting of the chromosomes, which occurs during the next mitotic cycle, a resting stage intervening. This comparison with *Ascaris* and the salamander adds more doubt to the already very doubtful interpretation of the appearance in the telophases of *Opalina* as indicating a splitting of the chromosomes.

Calkins & Cull (1907) found that splitting of the chromosomes occurs in the two maturiation divisions of *Paramaecium*, but not in the third division by which the conjugating nuclei are formed. The ordinary vegetative divisions of *Paramaecium* have not been so studied as to show whether splitting of the chromosomes occurs in them or not. Neither Hamburger (1904) nor Calkins & Cull show its presence in the nuclear divisions immediately following conjugation. These conditions suggest the possibility that in *Opalina* the maturation divisions may differ from the vegetative divisions and that splitting of the chromosomes may be found in the maturation divisions. I have used for the most part, with the minute individuals of *Opalina* in the spring, methods which do not show the finest details. My study of carefully stained sections has not yet shown in detail the phenomena of matnration. Another spring's work will propably be necessary to determine this interesting point.

An alternative explanation of the mitosis.

The alternative interpretation of the nuclear division in *Opalina* as a very primitive mitosis in which there is no longitudinal splitting of the chromosomes needs fnrther development. We have seen that the chromatin masses (properly called chromosomes only in certain conditions) are always branched, their branches being connected to form a network just beneath the nuclear membrane; and we have also seen that some of the fibres of the network are attached to the nuclear membrane at each of the two poles of the nucleus. This attachment of the fibres is very clearly seen when the spindle is well developed. The manner in which the nucleus constricts in each mitosis until the membrane at the equator of the nucleus pinches and holds the fibres of the spindle, explains the fact that these fibres are attached to the membrane only at the two poles. One night conceive each longitudinal chromatin fibre of the mitotic spindle in *Opalina*, with all its branches and with the two chromatin masses upon it, as forming one unit, the units being in con-

nection by means of their united branches (Text Fig. VI, B). When the division of the nucleus is completed, one would find in each daughter nucleus eight daughter units each consisting of a single mass of chromatin with many branches which unite with branches



Text Fig. VI.

agrams of mitosis in *O. intestinalis*, only 'o chromatin nnits, instead of eight, being own: A = an anterior nncleus in the irre-ılar "eqnatorial plate" stage, four danghter romosumes being present; B = an early aphase; C = a later anaphase; D = an rly telophase, the chromosomes being con-cted by their broad lateral ontgrowths.

Text Fig. VII.

Diagrams of mitosis in *O. intestinalis*, only two chromatin units being shown. E = a late telophase (spireme). The chromosomes are united into a ribbon which, if all the chromosomes were shown, would extend over nearly the whole nncleus. The undivided nncleolus is shown in the posterior danghter nucleus. F = an anterior daughter nuclens in an early prophase; the chromatin ribbon is breaking np agaiu into chromosomes; the uew nncleolus is forming near the more pointed end of the nnclens. G = an anterior nuclens in a late prophase; chromatin spherules have been formed.

of the neighboring chromatin masses to form the nuclear net which is always recognisable at all stages of mitosis, however faint the transverse fibrils may become. The chromatin masses of the neighboring units send out also broad plates of chromatin (Text Fig. VI, D) which soon completely unite them into a chromatin ribbon (Text Fig. VI, E). Preparatory to the next mitosis the chromatin masses of neighboring units again separate (Text Fig. VII, F and G) and each constricts into two thus producing sixteen chromatin masses, whose branches are all interconnected, each unit of course having two chromatin masses (Text Fig. VI, A). The eight units now draw in most of the substance of their lateral branches and reassume their position side by side in eight more distinct parallel lines stretching from pole to pole of the nucleus, each line having upon to two chromatin masses (Text Fig. VI, B). The cycle then repeats itself.

Upon this interpretation it would be seen that the division is not a highly developed mitosis, but that, still, by means of the persistence of the longitudinal chromatin fibres in all stages, even in the resting nucleus, and through their retention of their connection with the two poles of the ovoid nuclear membrane, the chromatin masses, after they divide, are able to send one of their daughter masses to each pole of the nucleus, securing thus a result somewhat similar to that obtained in the fully developed mitoses of higher animals. There is no means in this division to secure the distribution of one half of each granule of each chromosome to the daughter nucleus, but each daughter nucleus does receive about half of the mass of each chromosome of the parent nucleus. In this case, we see that the emphasis is upon the chromosomes and not upon the chromioles.

The evolution of mitosis.

Is this type of mitosis in *Opalina* aberrant or does it correspond to a stage in the phylogeny of the more highly developed mitoses of *Metazoa?* The nuclei of many, probably of all, *Plasmodroma* are centronuclei (Boveri 1900) each containing, in addition to the chromatin elements and indifferent plastin, a differentiated karyosom which functions as a more or less perfect centrosome. Compare *Euglena* (Keuten 1895), *Trypanosoma* (Schaudinn 1904, v. Prowazek 1905, Salvin Moore & Breinl 1907), *Amoeba* (Schaudinn 1894, Hartmann & v. Prowazek 1907). It is somewhat doubtful whether the simplest nuclei have differentiated karyosomes, but at any rate,

we may probably assume the former existence of such simple nuclei, even though they may not exist to-day.

One naturally conceives a series of stages in which both the plastin and the chromatin constituents of the nucleus are becoming more highly developed. On the one hand the phylogenetic development of the chromatic structures probably showed at one time a stage with the chromatin in the form of diffuse granules not grouped into chromosomes, and this may have been succeeded by a stage such as we now seem to have in Trypanosomes, in which we have diffuse granules irregularly arranged during the vegetative mitosis (Salvin Moore & Breinl), but true chromosomes during some of the divisions preceeding conjugation (Schaudinn, v. Prowazek). A further evolution gives definite chromosomes persisting throughout the whole life of the cell. Ultimately the chromosomes show morphological differences corresponding to their differences in function. On the other hand we conceive the plastin elements of the nucleus as giving rise to an intranuclear centrosome[1]), which soon becomes developed to the point of containing a centriole. The final development, showing a spindle and astral rays, is best seen when the centrosome becomes extra nuclear. The original centronucleus has thus evolved into an elaborate double set of structures, one consisting of the chromatin elements associated with some indifferent plastin, and the other being the kinetic plastin in the form of the centrosome, whose structure in some phases of mitosis becomes elaborately developed.

The conditions in *Opalina* seem to throw light upon this phylogeny, though its own nuclear structure seems aberrant and not to correspond to any stage in the phylogeny of the mitosis of higher forms. It seems to have substituted another and simpler mechanical device for the centrosome; has developed its mitosis to a certain point and has stopped there, unable to go further because of the absence of developed centrosomes. Its method of mitosis is simple and is efficient to a degree, but is incapable of producing the remarkably perfect results reached by those cells which kept and further evolved their centrosomes.

The indication that in the mitosis of *Opalina* the emphasis seems to be placed upon the chromosomes and not upon the chromioles is

[1]) The karyosom of *Plasmodroma* seems to consist of both plastin and chromatin and to be therefore more than a centrosome. It contains the centrosome. These relations are shown with especial clearness in an as yet unpublished paper by Hartmann upon *Amoeba tetragena*. See also Hartmann & v. Prowazek 1907.

not without significance. May it be that the longitndinal splitting of the chromosomes has been overemphasized, and is not so fundamental as is often thought, having been evolved from a less definite simpler method of division in which the chromosomes but not their granules divide into equal halves? Probably the vegetative divisions of the micronuclei of *Paramaecium* are of this type. Has this simpler type of division itself been evolved from lowly mitoses, like those in many *Plasmodroma*, in which there is no method of securing so eqnal a distribution of the mass of each chromosome to the daughter nuclei, no distinct and constant chromosomes, indeed, appearing to be present? In such divisions as these in the *Plasmodroma* the masses of chromatin in the two daughter nnclei may be about equal. Possibly amitotic division stands as still more primitive. It is difficult to distinguish the two in some cases. Has the individuality of the chromosomes and perhaps of the chromioles been developed *pari passu* with the elaboration of the process of division? Are the conditions in *Opalina* intermediate between ordinary amitotic division and highly developed mitoses, *Opalina* having a method of preserving the distinctness of the several chromosomes generation after generation, bnt not having a perfect method for securing such an exact equality of the daughter chromosomes as results from the longitudinal splitting in highly developed mitoses, in which one half of each chromiole goes to each daughter nucleus? The latter is secured only in mitoses in which the chromosomes split longitudinally and this, it seems, is not the case in *Opalina*, in which the persistent attachment of the two ends of each chromosome (chromatin nnit) to the two poles of the nncleus is the means of securing the separation of the daughter chromosomes and the independence of the several sister chromosomes. The conditions in the binucleated *Opalinae* seem to favor such a general interpretation as that here developed, but mitosis among the *Protozoa* must be better understood before one can accept as sufficient the evidence in favor of such a phylogeny of mitosis.

Opalina seems to have the chromosomes not only distinct but somewhat different from one another, as is indicated by differences in size and form. Of course differences between the chromosomes, once established, could readily persist if the schema of division snggested for *Opalina* is correct, and it seems to be so, provided one assumption is correct, namely, the assumption that when the chromatin ribbon constricts to form the chromosomes for the new mitosis, constrictions occur at points where the eight chromosomes

of the previous telophase nnited to form the ribbon. Fundamentally the same assnmption is involved in the belief in the individuality of the chromosomes in any animal. In the binucleated *Opalinae* the chromatin is less diffuse in the "resting nuclei" than it is in most animals, so that it is easier to conceive of the chromatin masses which appear before the new mitosis as being merely the old chromosomes of the previous telophase which have again become distinct. Each chromosome itself soon constricts into two, this being apparently the true division of the chromosomes. Division of some of the chromosomes may occnr at the time when the chromatin ribbon is constricting to reform the chromosomes, so that the number of masses coming out of the chromatin ribbon may be more than eight, but this, of conrse, does not affect the interpretation of the phenomena.

Nuclear condition and cytoplasmic movements.

Attention has been called to the fact that the two nuclei in the binncleated *Opalinae* are often in slightly different condition. This divergence is never great. In the multinucleated species the conditions of the numerous nnclei are very different. No disturbance of the movements of the cell arises from this diversity in condition of the different nuclei, which tends to confirm the general belief that the chromatin of the nuclens is not directly concerned in the control of protoplasmic movements. MEVES (1899) showed that secretion in the cells of the kidney in salamauder larvae is interrupted during mitosis, the chemical activities of the cytoplasm being influenced by the condition of the chromatin in the nncleus.

Analogies of the chromatin spherules.

Some light may be thrown npon the problem of the nature of the chromatin spherules and cytoplasmic sphernles by comparison with the conditions in other ciliate *Infusoria*. The macronucleus of most *Ciliata* consists of grannles aggregated into a more or less compact group. This gronp breaks np nnder certain conditions, the granules scattering through the whole endoplasm and soon disappearing by solution. When a new macronucleus is formed, it arises from one (or more?) of the micronnclei. The macronncleus of the *Ciliata* is generally regarded as especially connected with nutrition.

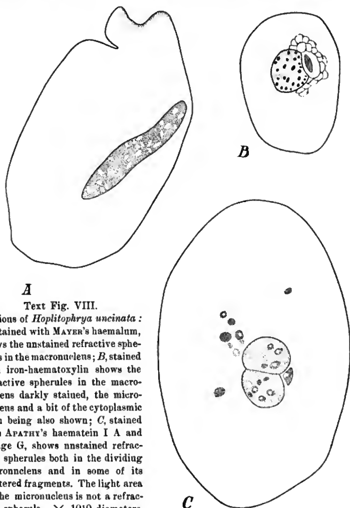
The chromatin spherules in *Opalina* are derived from the chromatin of the chromosomes and by their origin from chromatin and their solution and disappearance remind one of the macronuclear

granules of other *Ciliata*. But one notes a decided difference between the two. In *Opalina* the chromatin spherules are formed and dissolved in the course of every cell division, while in most of those *Ciliata* which have been most carefully studied the macronucleus dissolves and is reformed only during or after conjugation, or under conditions of nutrition which often induce conjugation. In *Hoplitophrya uncinata*, a probable near relative of *Opalina*, the macronucleus is very often found fragmented into granules or groups of granules which are scattered through the cell (Text Fig. VIII, C). One cannot believe that this fragmentation is usually connected with conjugation. I have not followed the fate of the scattered granules in *Hoplitophrya uncinata*, nor have I as yet had time to study carefully the abundant refractive spherules in the endoplasm of this species. They seem to be formed in the macronucleus and also in the scattered fragments of the macronucleus when this breaks to pieces (Text Fig. VIII). They do not react to *intra vitam* stains exactly as do the endoplasmic spherules of *Opalina*, yet they are probably of a generally similar nature. The apparent connection of refractive spherules and macronucleus in *Hoplitophrya uncinata*, and the freqnent fragmentation of the macronucleus, make this species a pecnliarly favorable one for the study of the refractive spherules and their relation to the macronucleus. I hope soon to give the matter further study. The scattered macronuclei of *Loxodes rostrum* (JOSEPH 1907) are perhaps comparable to the scattered groups of macronuclear granules seen in *Hoplitophrya*.

The relation of the refractive spherules in the endosarc to the chromatin spherules in *Opalina* is not fully established. The resemblance between the two in their staining reactions is not a demonstration of their relation, but it does suggest that the substance of the chromatin spherules may find its way into the endoplasmic spherules. This, is rendered still more probable by the fact mentioned that in *Hoplitophrya* apparently similar refractive spherules arise in the macronucleus and in the scattered groups of macronuclear granules when the macronucleus fragments.

Refractive spherules somewhat comparable to those in the endosarc of *Opalina* are not rare among the *Ciliata*, *Nyctotherus* and several species of *Balantidium*, present in the same hosts with *Opalina*, have many such refractive spherules in their endoplasma which, however, seem always to stain darkly with iodine. They are not composed of true glycogen but are apparently paraglycogen of a somewhat different nature from that in the spherules of *Opalina*.

It seems probable that some of the refractive bodies found in *Flagellata* and *Foraminifera* are of the same general nature. There seems to be something the same doubt as to the origin of the



Text Fig. VIII.
Sections of *Hoplitophrya uncinata:* *A*, stained with MAYER's haemalum, shows the unstained refractive spherules in the macronucleus; *B*, stained with iron-haematoxylin shows the refractive spherules in the macronucleus darkly stained, the micronucleus and a bit of the cytoplasmic foam being also shown; *C*, stained with APATHY's haematein I A and orange G, shows unstained refractive spherules both in the dividing macronucleus and in some of its scattered fragments. The light area in the micronucleus is not a refractive spherule. × 1010 diameters.

refractive bodies in *Pelomyxa* that there is as to their origin in *Opalina.* GREEF (1874) and GOLDSCHMIDT (1905) describe them as arising from the nucleus, GOULD (1893) says that they divide by

constriction. Stolc (1900) and Bott (1907), on the other hand, are certain that they arise in the cytoplasm and that they do not increase by division. Stolc describes them as consisting of two parts, an outer envelope and an inner snbstance, the latter glycogen, the former a carbohydrate. Bott confirms Stolc, agreeing that the refractive bodies are probably reserve nutritive material. The morphological strncture of the endosarc spherules in *Opalina*, with their outer layer of grannles and more lightly staining central-portion, resembles the structure of the refractive bodies of *Pelomyxa* and their interpretation as reserve nntrient material seems altogether probable, though they are not true glycogen. As already shown, the chromatin spherules of *Opalina* and the macronuclear granules of other *Ciliata* may be comparable. If, then, the endoplasmic spherules of *Opalina* are derived from the chromatin spherules, our series of comparisous would include the macronuclear granules of most *Ciliata*, the chromatin spherules in the nucleus of *Opalina*, the endoplasmic spherules of *Opalina*, and the refractive bodies in *Flagellata* and *Foraminifera*. There is a general resemblance also between the refractive spherules of *Protozoa* and the pyrinoids of plant cells. Both seem to be a reserve food supply and both are handed down from parent to child when the cells divide. We know nothing, however, to indicate any special connection between the pyrinoids and the substances in the nuclei of plant cells.

Phylogeny of the nuclei of Ciliata.

The question as to what in *Opalina* is the full homolog of the macronucleus in higher *Ciliata* can best be approached through a discussion of the evolution of the condition with two fuuctionally diverse nnclei. The macronncleus of higher *Ciliata* arises by the metamorphosis of a nncleus which has itself arisen by division from the micronucleus.[1]) It is therefore phylogenetically a complete nucleus and not a mere mass of granules extrnded from a nucleus and gathered into a group. The macronucleus seems to be specialized in connection with the nutrition of the cell. It is able to divide, as does the micronucleus, in the vegetative divisions of the cell, but it takes no part in the special phenomena, interpreted as maturation, which preceede conjugation. The micronucleus, apparently

[1]) Neresheimer (1908) does not describe the origin of the macronucleus in *Ichthyophthirius* (species?). The remarkable phenomena which he does describe, if correctly described, make it improbable that the macronucleus in this species arises by metamorphosis from a micronucleus.

holds in abeyance the functions connected with the nutrition of the cell, but the potentiality of these functions must be present, since daughter nuclei from the micronnclei are able to transform into macronuclei. Probably each type of nucleus is a complete nucleus, the nucleus especially connected with conjugation being slightly specialized by diminution of some of its functions and probably of the chromatic material upon which these functions rest. The macronucleus is specialized by the great development of its nutritive activities and a corresponding great increase in the amount of chromatin especially associated with these functions. The specialization and hypertrophy of the macronucleus seems to have gone so far that it is difficult to secure conjngation of the macronuclei, and so, partly as a consequence, the macronuclei degenerate. The germinal (unspecialized) chromatin is so overbalanced by the nutritive (specialized) chromatin in the macronuclei that it is unable to assert itself and bring abont conjngation of these nuclei, and, without occasional readjustment such as is secured through conjugation, ultimate degeneration seems unavoidable.

Before copulation or conjugation there seems to be quite generally, among the *Protozoa* at least, a process of reestablishing the proper balance of the nutritive and other chromatin in the nucleus. It is apparently the nutritive chromatin which especially increases in amount during growth and ordinary vegetative divisions and the excess of this nntritive chromatin is gotten rid of before conjugation by the formation of chromidia, either the excess of vegetative chromatin leaving the nucleus, or the excess of this specialized chromatin being left in the nucleus, the ordinary chromatin going out into the cytoplasm and there reforming into a new nucleus or new nuclei, or, as in *Chromidina* (Gonder 1905), all the chromatin passing into the cytoplasm where after a time part degenerates and the rest forms the generative nuclei. We donbtless do not know the full significance of these phenomena, but this much seems probable, that there is division of labor between different parts of the chromatin and conseqnent hypertrophy of some parts during their periods of special activity. The specialization and hypertrophy of chromatin in connection with nutrition has gone so far in the macronucleus of *Ciliata* that it is simpler to secure a new macronucleus than to reestablish in the old macronucleus such a balance of the respective parts as will allow it to share in conjugation.

What was the phylogenetic origin of the condition with two nnclei, one of which is highly developed for nutrition while the other

remains minute and hardly shares in the activities of growth. The divergence must have occured in a binucleated (or multinucleated) condition. We have in *Opalina* such a binucleated (or multinucleated) form. In what way could its condition with similar nuclei be changed into a condition with dissimilar nuclei?

First let us note again the fact that the nuclei of the binucleated *Opalinae* are often slightly dissimilar in regard to mitosis, one being often in a slightly more advanced condition than the other. There is a similar divergence in regard to the formation of the probably nutritive chromatin spherules, one nucleus showing these in a more advanced stage of formation. The exact balance of the two nuclei seems already somewhat disturbed in *Opalina*.

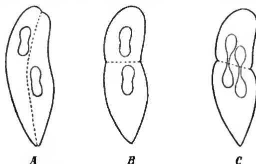
May we conceive this divergence as going further, the nutritive chromatin becoming hypertrophied in one nucleus and not in the other, the second nucleus ultimately giving up almost all its connection with nutrition and becoming much smaller, giving us ultimately the condition seen in higher *Ciliata* with very divergent micro- and macronuclei?

One thing seems to stand in the way of such an interpretation so far as *Opalina* is concerned: in the division of *Opalina* one whole nucleus, and not two half nuclei, is given to each daughter cell. The condition in *Opalina* is not a true binucleated condition. We have merely a delayed division of the body, which causes two daughter nuclei to lie for a long time in one cell, indeed even until they have entered upon the next mitosis. Division of the cell when it does occur is not associated with the mitosis in the nuclei which is taking place at the same time, but is really the delayed celldivion that belonged with the last nuclear mitosis. Division of the cell-body lags one step behind the division of the nuclei. To get a proper understanding of the real meaning of this division we must bring together that division of the body and that division of the nucleus which really belong together.

In attempting to do this we see at once that the direction of division of either nucleus or body must be changed. At present the long axes of nuclei and body coincide and remain constantly in this relation. The nucleus divides transversely and the body generally longitudinally.[1]) Can we find a plausible scheme which will get around this difficulty?

[1]) Longitudinal division of the body is characteristic of *Flagellata* and is doubtless, primitive for *Opalina*. Many *Flagellata* show nuclei which when dividing elongate at right angles to the plane of division of the body and then divide

The present condition in *Opalina*, with an apparent but not a true binucleated state, could be changed into a true binucleated state comparable to that of *Paramaecium*, if cell-division should change from longitudinal to transverse and at the same time should *bisect each of the two nuclei.* Instead of the condition shown in Text Fig. IX, *A*, as now, we would have that illustrated in Text Fig. IX, *C*, each cell recieving two daughter nuclei instead of one whole nucleus. From this condition, that of *Paramaecium* could be reached by functional and accompanying structural divergence of the nuclei, as suggested above. The ordinary infrequent transverse divisions of the binucleated *Opalinae*, do not help us in this schema, for they do not bisect the nuclei (Text Fig. IX, B). The false binucle-



Text Fig. IX. Illustrating the development of the truly binucleated condition of the higher *Ciliata* from a pseudobinucleated form like *Opalina*. *A* and *B* are drawings of actual conditions found in *O. caudata*; *C* shows a hypothetical transverse division which bisects the two nuclei.

ated condition of *Opalina* can be changed to a real binucleated condition only by the complete suppression, not the mere delay, of one division of the body. Were this to occur, then a transverse division of the body, such as we occasionally find, would bissect the two nuclei, being not a delaged division belonging to the last mitosis, but the division which properly belongs with the present mitosis of the two nuclei (Text Fig. IX, C). We can conceive the same result as following still longer delay in the postponed division of the

across the equator, their plane of division coinciding with that of the body. In Trypanosomes as in *Opalina* the division of the body and that of the nucleus are not synchronous and the planes of division of nucleus and body do not coincide. One cannot say which is the more primitive condition, that which does or that which does not show coordination between the division of the nucleus and the division of the cytoplasm.

body, it not occuring until the daughter nuclei are separated to a considerable distance, so that the division of the body (transverse in this case) conld easily pass between the daughter nuclei, producing thus in each daughter cell a truly binucleated condition.

It seems to me quite probable that snch has been the history of the evolution of the binncleated condition in higher *Ciliata*: first delay in division of the body, establishing a temporary binucleated condition; then complete snppression of this delayed division of the cell-body, establishing a true binucleated condition, each nucleus, as apparently now in *Paramaecium*, belonging to a potentially, but not actnally, independent individual.

The remarkable phenomena which Neresheimer (1908) describes for *Ichthyophthirius* probably cannot be brought into harmony with the interpretation of the nnclear conditions in the *Ciliata* here suggested. There are gaps in Neresheimer's work, and an absence of detail in both figures and description, which make it desirable that this genns be further studied.

Compound nature of the Ciliata.

The trnly binucleated forms, as well as the falsely binncleated *Opalinae* are really potentially double individuals; and similarly the mnltinucleated *Opalinae*, arising by further temporary suppression of divisions of the body, are highly compound forms composed of many potential individuals. These individuals all become ultimately distinct before or in connection with copulation, even in the mnltinucleated *Opalinae*, the temporarily suppressed divisions of the body finally appearing rapidly in the spring and producing nnicellular gametes.[1])

The phenomena in the spring which preceede and accompany copulation.

Phenomena in *Opalina intestinalis*.

As the breeding season of the host approaches most of the *Opalinae* in the rectum increase the rapidity of their division, be-

[1]) The fact that the macrogametes are often still binucleated at the time of conjngation does not indicate that they are really binncleated forms, but merely that conjugation may occur before the complete separation of the definitive gametes, as if fertilization in a Metazoan should occur before completion of the maturation of the egg. Compare pages 285 and 290.

coming very minute, a few individuals retain nearly their full size and do not encyst, but remain in the rectum of the frog, apparently continuing the infection of the host. The minnte individuals encyst, pass into the water with the foeces of the host, and are eaten by tadpoles, in whose alimentary canals the little *Opalinae* work their way ont of the cysts and divide, forming micro- and macrogametes which copnlate. [1])

Decrease in the number of chromosomes.

In the later mitoses before encystment one finds bnt four (Fig. 120, Pl. XXII) instead of eight (Fig. 119, Pl. XXII) chromosomes. This change in the number of the chromosomes takes place in animals from fonr to eight times as large as the individuals which enter the cysts. It occurs before the vegetative chromatin is thrown out of the nucleus, the latter process, under normal conditions, taking place just before encystment and in the cysts or in the rectum of the tadpole. The decrease in the nnmber of the chromosomes might be due either to their union in pairs (synapsis of Montgomery) or to an actnal "reduction division" at this stage. The chromatin ribbon breaks into eight instead of sixteen parts, and these do not seem to be nnusually large. Possibly counting the grannles in these chromosomes would show whether they are double or not. I have not yet done this, snch work being necessarily slow, and my material needing restaining before any such counts can be made. It will probably be necessary to wait nntil another spring in order to have snfficient favorable material for studying this interesting point. The reduced number of chromosomes persists until copulation occurs (*cf.* Fig. 148—152, Pl. XXII; 168, 173, Pl. XXIII; 183, 185, 187—191, Pl. XXIV).

The last division before encystment.

One sees very clearly that in the last (?) division by which nninncleated animals ready for encystment are formed no mitosis of the ordinary type occurs (Figs. 121, 122, Pl. XXII). The nnclei seem not to be in division at all, bnt rather are occnpied in getting rid of a part of their chromatin, a process which will soon be described.

---

[1]) It seems necessary to accept the german nse of the word copnlation to denote fusion of two gametes to form one zygote, and of the word conjngation to denote the mutual fertilization of two gametes each by the other, as in higher *Ciliata*. The natural English use of these words would be the exact reverse.

The uninucleated condition is reached by suppressing one nuclear division while the body divides. There is at no time any such degeneration of nuclei as Neresheimer has described for *O. ranarum* and *O. dimidiata*, nor is there any formation of new nuclei from chromidia in the cytoplasm. The old nuclei discharge a portion of their chromatin and themselves persist as the reproductive nuclei.

Extrusion of vegetative chromatin.

In living nuclei, at this stage, which are getting rid of a part of their chromatin in this peculiar manner, one observes two large balls or discs which by staining are clearly shown to be composed of chromatin (Figs. 121—139, Pl. XXII; 236, Pl. XXV). Occasionally instead of two such chromatin spheres one finds three (Figs. 132, 134, Pl. XXII), one or two of these being smaller. In other cases but one sphere is found, but in these cases another may have been present and have been extruded. The rest of the contents of the nucleus lies in the form of granules, generally in an hour-glass-shaped group, transversely, between the two chromatin spheres when two are present (Fig. 121). In the nuclei of the cysts one finds sometimes one (Figs. 131, 135, 138, 139, Pl. XXII; 236, Pl. XXV), sometimes two (Figs. 136, 137, Pl. XXII), sometimes three (Figs. 132, 134, Pl. XXII) such chromatin spheres. In the animals hatched from the cysts one finds usually but one such compact sphere of chromatin, or often none, the granules remaining in the nucleus being often also gathered into a spherical group, which however in both the living animals and in acetic carmine preparations can be distinguished from the denser sphere. When stained with Delafield's haematoxylin the difference between the two is very clearly seen (Figs. 136, 137, Pl. XXII). By the time the gametes are ready for copulation, the dense chromatin spheres have entirely disappeared from their nuclei (Figs. 148—152, Pl. XXII; 168, 173, Pl. XXIII, also Pl. XXIV).

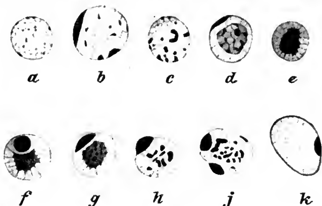
These compact spheres of chromatin are extruded from the nucleus into the cytoplasm and there degenerate. I have studied but little the minute animals in the rectum of the frog, before their encystment, and have but twice found in them the extrusion of the first chromatin sphere (Fig. 124, Pl. XXII; 279 [*O. dimidiata*], Pl. XXVII); I think, though, this usually occurs at this stage, as Neresheimer has said. In the cysts (Fig. 253, Pl. XXVI, *O. caudata*), and in young forms hatched from the cysts in the rectum of the tadpole (Fig. 143, Pl. XXII, and *O. dimidiata*, Pl. XXVIII, Figs. 306,

308, 309), I have often seen one or two compact chromatin spheres already extruded and lying in the cytoplasm, or in the process of being extruded (Fig. 302, Pl. XXVIII, *O. dimidiata*). In animals which, without being encysted, have been ingested by the tadpoles and have passed unencysted through the whole alimentary canal to the rectum, one often finds the extrusion of great masses of chromatin from the nuclei. These masses, sometimes before, but generally just after their extrusion, become reticulated, with lighter areas in the meshes of the heavily stained chromatin net (Figs. 237—247, Pl. XXVI). In some cases the nuclei from which the chromidia have been extruded show very distinct chromosomes (Fig. 238, 239, 241). In other cases irregular chromatin masses are left in the nuclei (Fig. 240). In still other instances the chromatin left in the nucleus is very finely granular (Fig. 245). In Fig. 241, in the posterior end of the body, is shown a hollow sphere of net-like chromatin surrounding an unstained central sphere. In many degenerating nuclei of *O. obtrigona* exactly similar structures were found (Figs. 104—109, 111—115, Pl. XXI). In a few instances, when the staining was exactly right, I have seen that the chromatin spheres in the cysts were composed of a net-like, darkly staining envelope surrounding a central sphere (Fig. 133, Pl. XXII: the central sphere was present but is not indicated in the drawing which shows the reticulated surface of the sphere). I have not yet attempted to test microchemically the nature of these central spheres. The unencysted ingested animals just described showed very clearly that the chromatin spheres fragment and scatter through the cell, there disappearing. It is not quite certain that always two chromatin spheres are extruded, but that there are usually two appears certain from the phenomena observed. It seems altogether probable that we have in these phenomena a throwing away of nutritive chromatin similar to that described by Hertwig, Schaudinn and others for numerous *Plasmodroma*.

I have described the formation of chromatin spherules during the course of each mitosis throughout the year (except perhaps just before and after copulation) and have suggested that these chromatin spherules are nutritive — comparable to the granules of the macronucleus of higher *Ciliata*. Their formation and extrusion is positively useful, being probably connected with nutrition and perhaps with the formation of the refractive spherules of the endosarc. The formation and extrusion of the large chromatin spheres before copulation is apparently negatively useful, leaving the nuclei in the right condition for copulation. It seems likely that the chromatin

spheres are composed of nutritive chromatin essentially similar to that seen in the numerous small chromatin spherules throughout the year.

Löwenthal (1904) describes the presence and manner of formation of one or more large dense chromatin spheres in the nuclei of encysting *O. ranarum* (Text Fig. X). He did not observe their extrusion into the cytoplasm. He interprets them as homologous with micronuclei, whereas they are probably more comparable with



Text Fig. X. Loewenthal's figures of the formation of a "micronucleus-like body" in the nuclei of *O. ranarum*: *a*, a nucleus with chromatin net and nodal thickenings; *b*, a nucleus with the chromatin gathered mostly into large masses at the periphery; *c*. shows the chromatin masses again fragmented; *d* and *e*, show the gathering of the chromatin at the center of the nucleus; *f—h*, show the separation of a compact darkly-staining chromatin sphere from the central mass, and its wandering to the periphery and suggest its possible extrusion from the nucleus: the material remaining in the central mass fragments and scatters through the nucleus; *j*, shows two chromatin masses at the periphery of the nucleus; *k*, a nucleus figured but not described by Loewenthal. × 2250 diameters.

macronuclei, being probably composed of nutritive chromatin. I have not studied the process of formation of these chromatin spheres with sufficient care to justify me in commenting upon Löwenthal's description of the manner of their formation. I would only suggest that it must be difficult to be certain of the sequence, of the isolated phenomena observed.

Neresheimer (1906 and 1907) gives an account of these chromatin spheres essentially similar to that I have given above. He emphasises the comparison of the two spheres with the two polar-bodies of *Metazoa* (*cf.* p. 302).

It is interesting to note that at least some of the individuals which pass unencysted through the alimentary canal of the tadpole to the rectum [1]) form and extrude chromatin spheres but not quite in the normal manner. I have not observed that they encyst if living in the natural species of tadpole. I have, however, had such individuals of *O. intestinalis* and *O. caudata* encyst in the recta of large tadpoles of *Rana esculenta* four days after the infection was secured, and have successfully infected tadpoles of *Bufo vulgaris* with these cysts from the *Rana esculenta* tadpoles. In two series of sections of the rectum of an tadpole of *Bombinator pachypus* infected six days with *O. intestinalis*, I find numerous large individuals with eight chromosomes, and numerous smaller forms with four chromosomes, extruding their chromatin. Perhaps in the rectum of the frog extrusion of the chromatin may occur either before or after the reduction in the number of the chromosomes, though usually, if not always, under normal conditions the extrusion occurs after the number of chromosomes has been reduced.

Encystment.

The number of nuclei in the cysts varies with the species and within the same species. In one series of preparations of *O. ranarum* out of 146 cysts tabulated 1 had no nucleus (abnormal), 25 had 1 nucleus of the ordinary size, 70 had 2 nuclei, 32 had 3 nuclei, 16 had 4 nuclei, 1 had 5 nuclei and 1 had 6 nuclei. According to NERESHEIMER (1907) three to five nuclei are most frequent. Six to twelve or more nuclei in the cysts are described by ZELLER, TÖNNIGES (1899), LOEWENTHAL and NERESHEIMER (1906 and 1907), though these larger numbers are infrequent. In *O. obtrigona* (ZELLER) and *O. dimidiata* (ZELLER, NERESHEIMER, METCALF 1907 *a*) conditions are the same (Figs. 285—288, Pl XXVII). In the binucleated species *O. saturnalis* (LEGER & DUBOSCQ), *O. intestinalis* (ZELLER, METCALF) and *O. caudata* (ZELLER, METCALF) the cysts have generally one nucleus (*O. intestinalis*, Figs. 130—136, 140—143, Pl. XXII; 236, Pl. XXV; *O. caudata*, Figs. 137—139, Pl. XXII; 252, 253, Pl. XXVI) though I have often found two nuclei in the cysts of the latter two species (Figs. 254, 255, Pl. XXVI). Occasionally one finds the binucleated encysted animal in the process of division (Fig. 255), though I do not think the division can often be completed until the animal emerges from

[1]) Compare the chapter on infection experiments, page 314.

the cyst, the free action of the cilia apparently being of great assistance in all divisions at all times of year, helping to separate the danghter cells. I have, however, found, two cysts of *O. caudata* each containing two individnals either entirely distinct or so nearly so that the connection between them could not be observed (Fig. 256, Pl. XXVI). Zeller and Loewenthal describe cysts of *O. ranarum* containing individuals in division, and Doflein qnotes Przesmecki as having seen the animals in the cysts divide into several offspring. I have seen nothing of this multiple division in the cysts.

The cysts do not need to lie in water in order to produce successful infection.

Tadpoles eat, often eagerly, the foeces of frogs and toads, so that it is easy to infect them. Ofter feeding cysts to the tadpoles the cysts will be found throughout the whole alimentary canal including the rectum. The little *Opalinae* leave the cysts nsually in the rectum of the tadpole but occasionally they are found in the small intestine. Wherever hatched the little *Opalinae* collect at the upper end of the rectum of the tadpole, jnst as the larger forms do in the rectum of the frog or toad. They mostly keep together, lying between the foecal mass and the rectal wall, a few individuals only being found scattered through the foecal mass.

I have studied the spring reproduction in *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. dimidiata*, and will describe the phenomena for all three species beginning with *O. intestinalis*.

The minnte forms of *O. intestinalis* ready for encystment do not have the body form characteristic of larger individuals, but look more like *Amoeba limax* (Figs. 121—129, Pl. XXII). They are ciliated, bnt the cilia are unusually delicate, being distroyed by acetic carmine, while the cilia of larger individuals in the same preparations are only considerably injured. The narrow posterior end of the body often shows a peculiar minutely lobulated appearance similar to what one often sees at the posterior end of an actively moving *Amoeba proteus* (Figs. 122, 123, Pl. XXII). Ectosarc and endosarc are distinct and each contains the usual sphernles. The last division before encystment is almost always longitudinal (Figs. 121, 122, Pl. XXII) but possibly may sometimes be transverse (Fig. 123, Pl. XXII). I have not had the good fortune to see the whole process of encystment in any species. Zellea describes the process for *O. ranarum* as follows (p. 359). — "*Die Tierchen schwimmen zwar noch eine Zeitlang mit großer Lebhaftigkeit umher, dann aber werden sie zusehends langsamer in ihren Bewegungen, ziehen sich kugelförmig*

zusammen und scheiden, indem sie sich dabei schneller oder langsamer drehen. eine farblose, glashelle Cyste um sich ab."

The cysts vary considerably in size. They are mostly spherical or nearly so, some are oval (Fig. 130, Pl. XXII), and a few somewhat irregular in form. One frequently sees encysted animals many of whose ectosarc sphernles are at the extreme onter edge of the ectosarc (Fig. 134, Pl. XXII), and in a few instances, I have seen cysts in which, between the cyst wall and the ectosarc, there were nnmerons refractive globnles which seemed to be extrnded ectosarc sperules (Fig. 135, Pl. XXII). It is easy to see in some cases a mass of granular debris left behind, in the cysts which the animals are leaving (Fig. 140, Pl. XXII). Other cysts are left entirely empty when the animal hatches, no such debris being found (Figs. 142, 143, Pl. XXII). It seems as if some individnals, during encystment, got rid of an excess, throngh generally not of all, of the ectosarc sphernles.

Cysts of *O. ranarum* stained with Moore & Breinl's lithium-iron-haematoxylin often show the presence of endosarc spherules. On the other hand many cysts contain no endosarc spherules. In minute individnals ready for encystment and in slightly larger forms, similar diverse conditions are seen. In the binucleated species and in *O. dimidiata* most if not all of the animals hatching from the cysts contain endosarc spherules. The presence or absence of the spherules in *O. ranarum* is probably dependent on nutrition.

It happens that none of my sketches of *O. intestinalis* show binncleated cysts, though I have seen many. Fig. 124, Pl. XXII, shows a binncleated individnal in the process of encystment.

Before hatching from the cysts the little *Opalinae* become very active, the speed of their revolutions increasing until one becomes fairly dizzy as he watches them. Cysts in the dnodennm of the tadpole may contain these very active animals, indicating that hatching may take place soon after ingestion. Mnch more frequently hatching occnrs in the posterior part of the intestine or in the rectum. The cyst wall weakens at some point and the little *Opalina* squezes throngh, sometimes slowly, sometimes rapidly, and swims off with a very rapid motion quite different from the motion of other individuals. The newly hatched individuals have well developed cilia, longer in proportion to the size of the body than are the cilia of larger forms Figs. 140—144, Pl. XXII). The cysts begin to hatch within three honrs of the time of their ingestion, probably even earlier.

Leger & Duboscq (1904 *a*) describe a second type of "endogenous cysts" for *O. ranarum*. In an ordinary multinucleated individual, a bit of protoplasm containing one to four nuclei is said to isolate itself from the rest of the protoplasm and acquire a cyst wall. The cyst so formed is extruded from the body of the parent. This description, which is very brief and unillustrated, needs confirmation before it can be accepted. No other student of *Opalina* has seen anything of this sort.

The formation of the gametes.

Longitudinal division is observed almost as soon as one finds the animals hatching from the cysts, (Figs. 146, 147, 153, Pl. XXII). I have found no way of determining how many divisions take place before the gametes are formed. The minute animals do not live long enough outside the body of the tadpole to allow one to directly follow the phenomena from the time of hatching from the cyst to conjugation. Size is not a safe criterion, for the cysts and the animals that hatch from them are of various sizes; so also are both the micro- and macrogametes. Time relations have failed to determine the point, for one cannot be certain how long a time is required for one division, and the time when one observes copulation is different in different infections.

In animals removed from the tadpole and placed in salt solution with a bit of the rectal wall and some of the rectal contents, divisions just begun before removal from the host require generally from two to twelve hours to complete even under the most favorable conditions; in many other cases division is not completed at all, even pairs which upon removal from the host were almost distinct remaining unseparated after more than twelve hours. It is not improbable that division under natural conditions in the rectum may be more rapid than in even the most favorable artificial cultures. In one series of infections both micro- and macrogametes were abundant after forty-two hours and frequent instances of copulation were observed. Generally copulating pairs are abundant fifty to eighty hours after ingestion of the cysts. In material five and a half days after feeding the cysts I have found many zygotes but not copulating pairs. The average time required between ingestion of the cysts and copulation is therefore uncertain, as is also the number of divisions that intervene, if indeed the number be constant. In the multinucleated *Opalinae* the number of nuclei in the

cysts varies from one to twelve, so prohahly the numher of divisions intervening hetween hatching from the cyst and the formation of definitive gametes is not constant. We have already seen that the condition of the nuclei in different cysts is different, indicating that the time required after hatching to produce the ripe gametes may he different in different cases.

As a result of the divisions following emergence from the cysts, two sorts of gametes are formed 1) macrogametes which do not markedly differ from the individuals of the asexual generation[1]) and 2) microgametes of very minute size and peculiar form. The macrogametes differ from the asexual forms in heing smaller and in having relatinly longer cilia (Figs. 144, 148, Pl. XXII; 164, Pl. XXIII). They have one (Figs. 164—168, Pl. XXIII; 183, 185, Pl. XXIV; 210, Pl. XXV) or two (Figs. 170—180, Pl. XXIII) nuclei. Prohahly the typical fully mature gamete would he nninucleate, but copulation may occur hefore the final division which produces the uninucleate condition. The nnclear phenomena following copulation will soon be described. The macrogametes have large excretory organs, often very clearly seen in these small bodied forms (*cf.* Metcalf 1908 *b*). In the Opalinas, at all times of year, the excreta, which are for a time dragged behind the body, are sticky. They are no less so in the macrogametes (Figs. 147, 153, Pl. XXII), hut this stickiness of their excreta is not a phenomenon comparahle in any way to the stickiness of *Paramaecium* when ready for conjugation (Calkins 1906) and has no relation to copulation.

The microgametes are much smaller (Fig. 163, Pl. XXIII). Their cilia are few in numher and are long and weak. They are ahsent from the posterior end of the hody, which is drawn out into a long and slender tail which is bent, generally at right angles, near its base, at a point usually about midway in the whole length of the hody. This hend in the tail probahly aids in securing spiral movement in swimming. Near the tip of the tail is usually a small swelling. Perhaps this is always present in functional microgametes. The tail appears homogemous and transparent. It seems to he composed of ectosarc alone. It is very sticky. One imagines that the little swelling near the tip is a special accumulation of the sticky material, but the animals are so small that it is not easy to find conclusive evidence of this point. The stickiness of the microgametes is

[1] *Opalina* has no trne alternation of generations, so that this term whil convenient to use, is not strictly accurate.

clearly an adaptation to copulation and is probably comparable to the stickiness of the isogametes in *Paramaecium.*

The microgametes usually swim tail foremost, though sometimes one finds them swimming in the opposite way. Doubtless the habit of swimming with the sticky end of the body foremost is an adaptation to copulation, helping the gametes to become attached. I think that the microgametes which an found swimming with the tail behind lack the ball of sticky material near the tip of the tail. In every case in which this point was noticed it was found to be so, but the observations are too few to make one certain that mature and immature microgametes can always be distinguished by their mode of swimming. The microgametes contain but one nucleus. This is usually difficult to see in the living animal, though sometimes it shows clearly. No excretory organs or extruded excretory granules are seen in the microgametes, but the extruded granules are sometimes found in the mother-cells from which the microgametes arise and in individuals of the preceeding generation. Endosarc spherules are present in the microgametes (Fig. 161, 163, Pl. XXIII). Ectosarc spherules are found in the microgametes of *O. caudata* (Fig. 259, Pl. XXVI) and *O. dimidiata,* and are doubtless present in the microgametes of *O. intestinalis* also, though I find nothing in my notes upon this point.

The gametes arise by longitudinal division in every case which I have observed (Figs. 146, 147, 143, XXII, 159, Pl. XXIII). Apparently transverse division does not occur between the time of hatching from the cyst and copulation, though it might be about as frequent as in the asexual generation and still very likely not be observed. There is nothing of special note in the divisions which result in the formation of the macrogametes. Division begins almost always at the anterior end (Fig. 146, 153, Pl. XXII) rarely at the posterior end (Figs. 207, 209, Pl. XXIV) sometimes at both ends at the same time (Fig. 147, Pl. XXII). The strand of tissue, which ultimately is all that is left connecting the two daughters, may lie at any level in the posterior two-thirds of the bodies; usually it is quite near to the posterior end.

In the formation of the microgametes the divisions for at least two generations do show some divergence from the ordinary divisions. The daughter cells are more slender than usual and they seem to have unusual difficulty in pulling apart. The division begins apparently always at the anterior end of the body and moves bockwards until the daughter cells are connected only by the extreme

posterior tips of the bodies (Fig. 159, Pl. XXIII). The daughter cells, by attempting to swim in opposite directions, draw the posterior ends of their bodies out into slender points before they finally separate (*cf. O. dimidiata*, Figs. 307—309, Pl. XXVIII). The very pointed animals which thus arise (Figs. 154, 155, 160, Pl. XXIII) can by this feature be distinguished from the macrogametes and the cells from which the latter arise. This division required in some observed instances from two to fonr hours, reckoning from the first appearance of bifurcation of the anterior end of the body until the complete separation.

A second division of the same type follows. It may begin in one of the danghter cells before the last division is complete (*cf. O. dimidiata*, Figs. 308, Pl. XXVIII). I have never seen both daughter cells so dividing again before their separation. One cannot say how many divisions of this sort occur before the definitive microgametes resnlt. In the final division which forms the microgametes a very long and very slender thread is drawn out between the two danghter cells. It seems as if the animals become more sticky at their posterior ends and so have more difficulty in separating. One can watch the elongation of this thread until it becomes finer than one of the cilia of the body. It may reach a length more than twice as great as that of the body proper of one of the animals. Generally, on this thread, the point of original contact of the two bodies is indicated by a few granules resembling excretory granules with sometimes a little debris. One can thus determine that the elongation of the two bodies is frequently unequal, even as much as two-thirds of the thread coming from one daughter-cell. It seems probable that the tail of the microgamete is derived from this thread. In several cases in which I saw one danghter-cell dividing before it had completely separated from its fellow, the dividing cell had by far the longer tail. In each instance the undivided cell was somewhat pointed posteriorly, but had practically no tail (*cf. O. dimidiata*, Fig. 308, Pl. XXVIII). It is possible that the gametes are formed by differential division, the two sorts diverging at least one generation before the formation of the definitive gametes. This is, however, merely a suggestion with very insufficient evidence in its favor.

There are two sorts of tailed forms 1) larger ones with short straight tails (Figs. 154, 155, Pl. XXIII, *cf. O. dimidiata*, Pl. XXVIII, Figs. 307, 308) and 2) smaller forms with much longer tails usually bent at a right angle (Fig. 163, Pl. XXII). Only the latter have

the ball of sticky material near the tip of the tail. These are the true microgametes. I have seen individuals of the first type in a late stage of division and have followed the division to its completion seeing two forms with very long tails arise from one short-tailed form (Figs. 159, 160, Pl. XXIII). I have never seen the transformation of such danghter-cells with long straight tails into typical microgametes with bent tails bearing a ball of sticky matter near their tips. This transformation does not occur immediately after the division. It seems to be the tailed microgamete mother-cells which Neresheimer has described as the gametes of *O. dimidiata.* I do not find either these or the true gametes of either type *"ganz platt"*, as he describes them. All are generally circular in cross section, thongh they may be broadly oval. The microgametes vary in size; so do the short-tailed forms from which they arise. The largest of the true microgametes are nearly or quite as large as the smallest of the short-tailed forms.

In my preliminary notice (Metcalf 1907) I wrote "The tailed gametes are of two sizes, one about twice as large as the other, the smaller being found from the larger by longitudinal division". This was probably an error. There are larger and smaller microgametes. the largest being fully twice as large as the smallest, but it is doubtful if the latter arise from the former, both probably arising by division of the short-tailed forms, as described. In one case, I have seen, in *O. dimidiata*, a microgamete mother-cell, in process of division, attached by its unusually long straight tail to the center of the body of a uninucleated macrogamete no larger than the microgamete mother-cell (Fig. 313, Pl. XXVIII). The attachment was a firm one, lasting over three quarters of an hour while the animals were actively swimming. During this time no change occurred. The individuals were then lost. This seems to have been probably an abnormal attempt to copulate on the part of a microgamete mother-cell. I donbt if it wonld have been successful or if it indicates that fully formed and functional microgametes are accustomed to divide.

Both sorts of gametes are often numerous in the rectum of the tadpole. The forms resembling macrogametes are far the more numerous, probably in part becanse one cannot distinguish the definitive macrogametes from forms destined to divide further. The largest number of microgametes seen in one rectum was seventy eight; in the same rectum the number of pairs was forty-two; and the number of the larger, tailed forms (parent-cells requiring probably

bnt one more division to form definitive microgametes) was twenty-two. Similar proportions, hnt with smaller numhers, were freqnent.

Copulation.

In copnlation a microgamete fuses completely with a macrogamete (Figs. 210—217, Pl. XXV, also 164—182, Pl. XXIII). The first contact is purely accidental, there being no evidence of any attraction of the gametes for one another. NERESHEIMER describes the short-straight-tailed forms in *O. dimidiata*, which he interpreted as gametes, as circling aronnd each other, as if under the influence of some mutnal attraction. May this not have been merely the usual spiral movement seen in all *Ciliata* and *Flagellata*, appearing circular in this case hecause confined hy the slide and cover-glass almost to one plane? The microgametes cling to anything which they tonch with their sticky tails, thongh they seem never to cling to one another. Indeed I helieve I have never happened to see two of them in contact even for a moment.

The animals in the rectum gather chiefly in a single group (sections of the recta show this clearly). They have the same habit of gathering in groups in the slide cultures, collecting usually ahont some bit of foecal matter. In such a group there are often thirty to one hundred forms which look like macrogametes and perhaps a dozen microgametes. The latter are constantly striking the macrogametes, clinging to their cilia and again hreaking away, either because of the active swimming movements of the macrogametes, or hecause of violent contact with other individuals. Even trne copnlating pairs may be torn apart by other individuals swimming between them. In two such instances copulation between the intrnder and the microgamete immediately followed. Frequently two (*O. caudata*, Fig. 271, Pl. XXVII) and once three microgametes were seen attached to the cilia of one macrogamete. Microgametes were seen attached to individuals in an advanced stage of division to form two macrogametes (*O. caudata*, Figs. 269, 270, Pl. XXVII). They seem readily to attach to any of the individuals of the macrogamete type.

The loose attachment of the microgamete to the cilia of the macrogamete changes to the closer union and ultimate fusion of copulation (Figs. 210—217, Pl. XXV, various, stages on Pl. XXIII, *cf. O. caudata*, Pl. XXVII). The tail of the male fuses at its tip with the hody of the female: then the tail of the male becomes

shorter and thicker and, after from half an hour to an hour, the two bodies are almost completely fused. Frequently one can distinguish for quite a time upon the zygote a slight protuberance bearing a few weak cilia of the microgamete type, thus marking very clearly the point of fusion, which may be in any region of the body (Fig. 182, Pl. XXIII, *cf. O. caudata*, Figs. 265, 268, Pl. XXVII). I have seen all possible stages in the copulation, have three times followed the whole process from the first contact (observed) to the complete fusion, and have many times followed the process through the earlier or later or middle period and have then killed and stained the animals in order to observe more closely the nuclear phenomena.

The macrogametes may have either one or two nuclei (Pl. XXIII). The microgamete has always but one. When the macrogamete is uninucleated the nucleus may be in the resting stage (Fig. 164, Pl. XXIII) or in mitosis (Figs. 167, 169, 170, 182, Pl. XXIII); similarly the two nuclei in the binucleated females may be either resting (Figs. 171—173, 178. Pl. XXIII) or in mitosis (Fig. 180, Pl. XXIII). I have never seen the nucleus of the microgamete in mitosis before the complete fusion of the two bodies.

When the macrogamete has but one nucleus this unites obliquely end to end with the nucleus from the microgamete (Figs. 187—196, Pl. XXIV). The two nuclei apply themselves closely, and ultimately the double membrane between them breaks down (Figs. 191—193), sometimes first in the middle sometimes first at one edge.

If the macrogamete has two nuclei, conditions become more complicated. If the two female nuclei are in the resting condition, the male nucleus may fuse with either one. In one instance of copulation of this type I have watched the entrance of the male nucleus and have seen it fuse with the posterior nucleus of the macrogamete, the resultant fusion nucleus being considerable larger than the other nucleus in the same zygote (Figs. 174—177, Pl. XXIII). I had a single acetic-carmine preparation which suggested that the male nucleus had entered and had passed by the posterior nucleus of the binucleated macrogamete and was just uniting with its anterior nucleus (Fig. 186, Pl. XXIV). Sometimes one sees the male nucleus lying between the two female nuclei, generally nearer to the anterior one (Figs. 197—200, Pl. XXIV). In one lot of fine material from an eighty-eight hour infection I found that over fifty of the binucleated forms had one nucleus (almost always the anterior one) much the larger. In some of these larger nuclei it was easy to see

eight chromatin masses which were donbtless eight chromosomes (Figs. 201—203, Pl. XXIV), showing that the nuclei were syncaria resulting from copulation.

Copulation may occur while the single nucleus of the macrogamete is in division. In this case the male nuclens waits until the division is complete and then fuses with one of them, the anterior one in the best case I have observed (Fig. 200, Pl. XXIV).

Both nuclei of the macrogamete may be in division when copulation takes place. One preparation showing this condition was very clear (Fig. 204, Pl. XXIV). The male nuclens, by its longitndinal striation and the position of its chromosomes in two polar gronps, showed that it also was dividing. A second preparation shows a zygote in division with each of the femali nnclei already divided, giving fonr daugther nuclei and the male nucleus, in an early stage of mitosis, lying beside them (Fig. 208, Pl. XXIV). Under perfectly normal conditions division of the cell-body of this animal shonld have occnrred before the complete division of the nuclei. Another preparation of a daugther cell [1]) just from division and whose nnclens was in a little later telophase than the female nuclei in the next to the last case, showed a male nuclens lying against the constricted portion of the dumbbell-shaped female nucleus (Fig. 206, Pl. XXIV). This male nucleus was in a very early anaphase stage of division. It mnst have entered before the division of the macrogamete and have passed to one of the daughter cells (*cf.* Fig. 204, Pl. XXIV).

I have seen two instances of another condition which may possibly stand as the next term in this series of copulation conditions. These individuals seemed each to show four nuclei. In one instance the four nnclei were in an oblique row (Fig. 207, Pl. XXIV). As the posterior end of the body showed a slight division-furrow, it is somewhat donbtful if this was a zygote. It may possibly have been a dividing binuclear macrogamete in which the dumbbell-shaped nuclei overlapped, somewhat more than in Fig. 204, Pl. XXIV, producing in edge view the appearance of fonr nuclei. The preparation, stained with acetic-carmine was not entirely clear. The other instance was of a living animal, a dividing macrogamete, with a considerable division furrow at its posterior end (Fig. 209, Pl. XXIV). It seemed to show four unusually small nuclei side by side in pairs, but the pictnre was not very clear. Both of these

[1]) That it was a daughter cell fresh from division was indicated by the irregular contour of one side, the side by which it had been attached to its sister cell.

cases are so doubtful that they can hardly be taken into account in endeavoring to understand copulation. They may also have been abnormal, division of the body being delayed beyond the proper time, giving nuclear relations not found in perfectly normal cells. In all other cases described the phenomena were clear.

It is uncertain what would have been the further history of each type of zygote described. When the male nucleus unites with one of the nuclei of a binucleated macrogamete, it seems probable that the next division would separate the syncarion from the smaller nucleus, one going to each of the daughter cells, but I have not observed the division of these forms. If the binucleated zygotes do divide in this way, one sees no reason why the daughter cell which receives the nucleus with four chromosomes might not itself fuse with another microgamete to form a uninucleated zygote, just as a polar body may be fertilized, but I have made no observations bearing upon the point. If it does not do so, it would seem to indicate that changed cytoplasmic conditions due to the entrance of the microgamete stand as a bar to further copulation. Professor Boveri tells me he has never succeeded in fertilizing a nonnucleated fragment of an already fertilized sea-urchin egg, though it is easy to fertilize fragments of unfertilized eggs. Sufficient study of old infections in *Opalina* would probably determine this interesting point. The comparison of these binucleated macrogametes with an egg, which has not yet completed its maturation seems a correct comparison, for doubtless the typical fully-formed macrogamete in *Opalina* would be uninucleated. Entrance of the male cell in *Opalina* seems to occur either after or during the maturation divisions, as in *Metazoa*.

The later history is much more doubtful in those cases in which the male nucleus divides before fusing with any of the female nuclei (*cf.* Fig. 204 and Fig. 206, Pl. XXIV). Fig. 206 seems to interpret Fig. 204 to the extent of showing that the dividing male nucleus all goes to one of the daughter cells. Apparently there it must so behave as to give four of its eight daughter chromosomes to each of the daughters of the female nucleus, but just how this is effected we cannot say. It might be either by fusing while the female nucleus is still incompletely divided, or by waiting until both nuclei are completely divided and then the four daughter nuclei conjugating in pairs. I hope to find in the sections of infected recta of the tadpoles answers to some of the questions still unsettled, but the preparation of the sections is difficult because of the dirt in the

rectum and their study with an immersion lens necessarily takes much time. I am, therefore, not delaying the publication of this paper until all of these sections have been made and studied. If from this study further results of interest are obtained, they will be communicated later.

In the material from the older infections one finds very many peculiar nuclei of huge size, much more pointed than usual and with peculiar spindles and chromatin (Figs. 222—227, Pl. XXV). It seems probable that these are copulated nuclei (syncaria). This is strongly suggested by such a condition as we see in Fig. 188, Pl. XXIV, in which we see the very pointed distal ends of the nuclei developed even before the two nuclei have fused at their apposed surfaces. I have not yet found such a spindle form in each nucleus in binucleated individuals, or in one nucleus while the other nucleus is in division according to the regular "asexual generation" type. I have however often found uninucleated gametes in a late stage of nuclear division in which the forming daughter nuclei were both of the peculiar type just described (Figs. 226, 227, Pl. XXV). It is doubtful whether the spindle form of these nuclei indicates division. The syncaria in many species of Protozoa are spindle shaped when not in division.[1] It is probable that such of my material as is carefully preserved does not include old enough infections to determine fully the phenomena following the copulation of the nuclei.

Cohn (1904) has described fundamentally different phenomena in the conjugation of *O. intestinalis.* It is evident that the animals seen apparently in conjugation could not have been *Opalinae.* The character of the nuclei, as well as the manner of the conjugation shows this. The brief unillustrated description of conjugation in *O. ranarum,* given by Léger & Duboscq (1904*a*) is also fundamentally different and is probably erroneous. They say that two *Opalinae* "resembling those of the ordinary cysts" come together by their anterior ends, lie for a long time rubbing against each other and turning, and then from a cyst which contains the two, each animal occupying half of the cyst. These phenomena are so divergent from those observed by other students that the description can hardly be accepted without confirmation. It is possible that Léger & Duboscq mistook the encystment of a dividing individual for conjugation, though with such experienced observers this seems improbable.

[1]) Somewhat similar spindle-shaped nuclei of peculiar appearance are found in degenerating *O. obtrigona.*

Neresheimer (1906, 1907) saw both microgametes and macrogametes and saw them in copulation (Compare his Fig. B, on p. 26. One of his drawings from this figure is reproduced here in Text Fig. XI), but he failed to recognise this as copulation, interpreting it as abnormal budding. The forms which he describes as isogametes seem from his figures to have been microgamete mother-cells. He once saw two of these come together by their anterior ends and gradually fuse, closing together like the blades of a pair of shears. The nuclear phenomena in this case were not followed. This he took as showing the presence of isogamous copulation. Doubtless it was abnormal. In one instance I have found in an acetic carmine preparation two short-tailed forms of *O. caudata*, apparently microgamete mother-cells, attached, the tail of one being united to the side of the other (Fig. 276, Pl. XXVII). This instance, with the single instance which Neresheimer describes, seems to indicate that very rarely microgamete mother-cells of the same size may unite. I have in one instance in *O. intestinalis* seen a microgamete attached by the whole anterior half of the body to a macrogamete, the tail of the microgamete, being free (Fig. 181, Pl. XXIII). Neither the previous nor the subsequent stages of this copulation were seen. It was of course abnormal in the sense of being a departure from the regular method of copulation, but it may not have been pathologic. It is similar to the instance that Neresheimer describes in that the male was not attached by its tail as in every other of the several hundred instances of copulation I have seen.



Text Fig. XI. One of Neresheimer's figures of "abnormal division in the formation of the gametes in *O. dimidiata*". This was probably the attempted copulation of three microgametes with one macrogametes.

Chromatin spherules in the gametes and zygotes.

In the mature nuclei, after the formation and extrusion of the chromatin spheres, I have not observed the formation of chromatin spherules, nor have I seen their formation in the syncaria soon after copulation. I cannot say positively that there is an interval when they are not formed, but this seems to be the case.

Nucleoli in the gametes and zygotes.

I have failed to find nucleoli in the nuclei of the gametes and younug zygotes. In older zygotes they are present.

Can the heterogamous copulation described be abnormal?

When I first saw heterogamous copnlation in *Opalina*, it seemed possible that it might be abnormal, for several reasons: — 1) becanse it was observed in material that had been about three honrs in a slide cnlture; 2) becanse the cysts from which the infection was secnred had not lain in water before being fed to the tadpoles; 3) because there were present in the cnlture individuals of different sizes which had passed unencysted through the alimentary canal of the tadpole to its rectnm. All donbt however was later removed. One of my best series of infections was secured from cysts which lay 36 honrs in water until all the unencysted *Opalinae* with them were killed. When opening, under the microscope, the recta of the tadpoles infected from these cysts, I very often immediately found typical heterogamons copulating pairs in different stages of copulation. Indeed nearly half of the drawings of gametes and zygotes of *O. intestinalis* on the accompanying plates were made from this series of infections. Other good infections were made in the same manner, giving similar resnlts. Six instances of heterogamous copnlation have since been found in a series of sections of the rectum of a tadpole infected sixty hours with *O. intestinalis* (Figs. 183—185, a, Pl. XXIV).

Encystment following copulation?

Neresheimer has described encysted individuals which he regards as zygotes. He believes that encystment normally follows copnlation. The zygote cysts, according to his description, are of the same size as the infection cysts, bnt are distinguishable by their usually spindle-shaped nuclei, by the fact that the animals more nearly fill the cysts, and by the faint concentric striation of the contained body. Neresheimer saw individnals containing two spindle-shaped nuclei become qniescent, change to oval form and throw off part of their cilia, and he interprets these changes as the early phenomena of encystment. Engelmann had already described for *O. ranarum* cysts with large nuclei in the rectum of the tadpole. Zeller described, for the multinucleated *Opalinae*, multinncleated cysts in the rectum of the frog and uninucleated cysts with large nuclei from the rectum of the tadpole. Influenced by the observations of these three students, I fully expected to find encysted zygotes in the recta of the tadpoles, but I have not seen them for any of the three species stndied.

It seems to me that the encystment, which I have often seen in dying zygotes and in dying individuals of other sorts, is abnormal. In material from infected tadpoles, which has been kept too long in slide cultures, one sees very many individuals of all sorts rapidly change the form of the body, becoming first oval, then spheroidal. Following this change of form, they throw off most or all of their cilia with many of their basal granules, and extrude part of their protoplasm in the manner so characteristic of *Opalina* when under pressure (Figs. 219—221, Pl. XXV). The pellicula remains as a very delicate cyst. Within this the body becomes very transparent and the nuclei and their contained chromatin become very clearly visible. Observe especially the granular chromosomes in figures 219 and 220 which show such pseudoencysted individuals drawn from ilfe, or rather death (*cf. O. caudata*, Fig. 275, Pl. XXVII). Figs. 210—218, Pl. XXV, show successive conditions in copulation and pseudoencystment in one pair of gametes from material of O. *intestinalis* forty-two hours after infection. In this case, after complete fusion of the two bodies, the male nucleus broke down, entirely disappearing in the cytoplasm of the zygote. The female nucleus remained long intact, showing considerable changes in the character and arrangement of its contents. Fig. 220 shows the condition in another pseudocyst of *O. intestinalis*, formed after the union of a binucleate macrogamete and a microgamete. The four granular chromosomes of each female nucleus were very clear. The male nucleus had but a single chromatin mass in one side of which an elongated body, probably a group of contiguous granules, was clearly seen. The excretory vacuole, with its contained excretory granules in Brownian movement, was also clearly seen. It lies uppermost in the figure. Fig. 219, is from a macrogamete of *O. intestinalis* which was found in copulation and was followed through a similar series of changes. In this case the nucleus of the macrogamete was in mitosis. Before copulation was complete the animals separated again and each formed a pseudocyst in the typical manner. There seems no doubt that these instances of encystment and all others observed were all abnormal and pathologic. I have never found encysted zygotes in material from old infections and I believe encystment after copulation does not normally occur.

I have occasionally seen infection cysts of *O. dimidiata*, with oval nuclei or with one of their nuclei oval while the rest appeared spherical (Fig. 286, Pl. XXVII). I doubt if the oval form of the nuclei can be taken as evidence that cysts are copulation cysts

(*cf.* Figs. 136, 138, 139, Pl. XXII). Many of the infection cysts are almost completely filled hy the little animals within them (Fig. 130, Pl. XXII). A faint appearance of striation, which is usually spiral but may be concentric, is often fonnd in the infection cysts, being due to the rows of cilia and their hasal grannles, the direction of the course of the lines being determined by the position of the animal within the cyst. These three featnres, which Neresheimer gives as distinctive criteria between the copulation cysts and infection cysts, seem insnfficient to estahlish the presence of copulation cysts. Neresheimer's description may possihly apply in part to the phenomena of abnormal encystment.

On the other hand, the description by Engelmann and hy Zeller, for multinucleated *Opalinae*, of nninncleated cysts with large nuclei, in the recta of the tadpoles, seems to indicate the presence of a second type of cysts, which might well he copulation cysts. If, however, there really are such copnlation, cysts, I do not understand why I have not found them. The ease with which cross infections are secnred in aquaria in which adults and tadpoles of different species of frogs are kept (see the chapter on infection experiments, p. 314) snggests that possibly some cysts of *O. intestinalis* or *O. caudata* might have been present in Engelmann's and Zeller's tadpoles, the infection cysts in these species having nsually a single nncleus. I have had collected tadpoles of *Rana temporaria*, *R. esculenta* and *Bufo vulgaris* become infected with hoth *O. intestinalis* and *O. candata* by leaving them an hour in a jar with adnlt *Bombinator pachypus*, while on the way from the field to the laboratory. Some of these tadpoles were already infected with Opalinas of the natnral species, so that, npon opening them, three species of *Opalina* were found living together. As the cysts of *Opalina* live in water for quite a time withont injury, of course such cross infection could he secnred hy placing tadpoles in aquaria in which the *Bombinator* adults had been placed, perhaps only for a short time, many, days before. Encystment after copulation seems to me doubtful. The matter needs further study.

Léger & Duboscq (1904 *a*) describe copnlation cysts of an utterly different type in *O. ranarum*. These cysts are said to enclose two distinct gametes which lie side hy side, each occupying one hemisphere of the cyst. I can suggest no satisfactory explanation of the phenomena, which were evidently not true copulation.

Phenomena in other species.

Opalina caudata.

In *O. caudata* all the phenomena are like those described in *O. intestinalis*, except that the redneed nnmber of chromosomes in the gametes is three instead of four (Figs. 249, 250, Pl. XXVI), as one would expect from the fact that in the nuclei of full-grown individuals there are six chromosomes. Compare Fig. 248, Pl. XXVI, in which each nucleus is in an early stage of mitosis showing twelve chromosomes ready to arrange themselves in donble rows preparatory to migration to the poles. Compare also Figs. 81 and 82, Pl. XX, which represent anaphases and a telophase in mitosis, the nnmber of chromosomes being clearly six.

The cysts have either one or two nuclei (Figs. 252—255, Pl. XXVI), and these show the characteristic chromatin spheres which are thrown off in the process of getting rid of the vegetative chromatin (Figs. 252—254). The gametes and the manner of their formation and the external and nnclear phenomena of copulation are similar to what has been described. (See Figs. 257, Pl. XXVI, to 276, Pl. XXVII. Observe especially the number of the chromosomes in Figs. 273—276.) I have not, however, followed the nuclear phenomena in the zygotes to quite so late a stage as in *O. intestinalis*. Fig. 276, Pl. XXVII, shows the only instance I have seen of the apparent copulation of eqnal gametes. The drawing is from an acetic-carmine preparation and I do not know what wonld have been the later behaviour of the animals.

Large chromatin spheres, ready for extrusion from the nnclei, are shown in Fig. 251, Pl. XXVI, in a rather small individual from the rectum of an adult *Bombinator pachypus.*

Opalina dimidiata.

In *O. dimidiata*, which is a mnltinucleated species, the earlier phenomena are somewhat different. The nuclei are not so easy to study, for they are small and the number of chromosomes is greater, apparently twelve in the full-grown forms. The chromatin is generally arranged in numerous granules just beneath the nnclear membrane, giving a very characteristic appearance (Figs. 277—280, Pl. XXVII). I find no evidence of degeneration of nnclei, or of formation of new nnclei from reproductive chromidia, as Neresheimer

describes. This species shows phenomena exactly similar to those described for *O. intestinalis* and *O. caudata* in the extrusion of the vegetative chromatin, the original nuclei persisting as reprodnctive nnclei (Fig. 285, Pl. XXVII; 299—306, Pl. XXVIII).

It is evident that the number of the chromatin masses in the nnclei of the minute *Opalinae dimidiatae* in the recta of the tadpoles is mnch less than in the larger animals in the frog's rectum. The nnmber of chromosomes seems to be either five or six (Figs. 307—309, Pl. XXVIII, indicating ten or twelve chromosomes in the nuclei of the full grown forms. I neglected to study this point carefully in the nnclei of the living animals and in the acetic-carmine preporations last spring, and have not yet worked through my preserved material of the gametes of this species, so that the statement of the reduced nnmber of chromosomes is based on sketches made withont that thought especially in mind. There is, however, no doubt that the number of chromosomes is reduced. The only doubt is as to the exact nnmber present.

The cysts have from one to seven or more (Neresheimer twelve) nnclei (Figs. 285—288, Pl. XXVII), and the animals which hatch from the cyst have as many (Figs. 289—292, Pl. XXVII; 299—303, Pl. XXVIII). On this account, as well as because the nnclei are less clear, this species is not so favorable for study. Macro- and microgametes arise as in the binucleated forms. The microgametes are simular to those described for other species, their tails sometimes being of very great length (Fig. 310, Pl. XXVIII). The true long-tailed microgametes arise by longitudinal division from short-tailed forms, as in other species (Fig. 308, Pl. XXVIII). The macrogametes, like the full grown individuals in the asexual generation, are often rather pointed posteriorly. On this account they frequently somewhat resemble the short-tailed mother-cells of the microgametes, but the latter can be distinguished by their fewer, longer and weaker cilia.

Copulation occours between nninulecated microgametes and macrogametes which have one or two (or possibly more?) nuclei (Fig. 312, Pl. XXVIII). The componnd nnclei resulting from fusion are unusually large, and they have a characteristic elongated spindle form which may indicate division; it is less pointed, however than that seen in the division of syncaria in the zygotes of the binucleated species. In this species the nuclei are more independent of one another than in the binncleated species, not dividing simultaneously bnt nsually one dividing while the other remains qniescent (Figs. 315, 316,

318—321, Pl. XXVIII). This fact renders the species unfavorable for the study of the nuclear phenomena following copulation.

Neresheimer's Text Fig. B. (page 26) is very interesting. That which he interprets as budding was probably copulation. The second figure seems to indicate the copulation of three microgametes with one macrogamete (my Text Fig. XI, Page 294). I have often seen two males attached to one female, but in every case the attachment was a loose one and not true copulation (*cf. O. caudata*, Fig. 271, Pl. XXVII). In the instance figured by Neresheimer the union seems to be an intimate one indicating true conjugation. It is to be regretted that Neresheimer does not figure the nuclei. If the macrogamete had several nuclei there seems no reason why several male nuclei might not enter at the same time and fuse with them.

Opalina ranarum.

I have not seen the gametes of *O. ranarum*. I have found the multinucleated cysts as described by other students (Fig. 326, Pl. XXVIII). The zygotes show large spindle-shaped nuclei, resembling those of *O. dimidiata*, *O. intestinalis* and *O. caudata* (Fig. 327, Pl. XXVIII).

Further general considerations.

Vegetative chromidia.

The extrusion into the cytoplasm of a portion of the chromatin, preceeding sexual reproduction, seems in all probability to be a throwing off of vegetative chromatin [1]) comparable to that described by R. Hertwig, Schaudinn and others in so many *Plasmodroma*. The disappearance of the macronucleus in conjugating *Ciliata* is propably a similar phenomonen. The solution, and osmotic expulsion from the nucleus, of the chromatin spherules during each mitosis in the asexual generation is probably also a somewhat related phenomenon, the chromatin spherules being probably nutritive, and their extrusion into the cytoplasm probably having to do with nutrition,

[1]) It seems to me altogether probable that there is no fundamental distinction between generative and vegetative chromatin, the latter being derived from the former. Generative chromatin is probably complete perfect slightly specialized chromatin, vegetative chromatin being secondary modified chromatin. If the modification is too great the vegetative chromatin is unable to share in the processes of conjugation and so degenerates. (Compare Hertwig 1907.)

In the latter case the "purpose" of the extrusion is positive, to aid in nutrition: in the former it is more negative, to free the nuclei from that which must in some way be a hinderance to reproduction.

Before comparisons can confidently be made between *Metazoa* and *Protozoa* as to the phenomena preceeding fertilization, the former must be carefully studied in the light of recent work upon the freeing of the generative nnclei in *Protozoa* from nutritive chromatin before sexnal union, and the *Protozoa* mnst be studied more successfully with reference to reduction division. Boveri (1887 *a*, 1892, 1899) has shown the extrusion from the nncleus and subsequent degeneration of a definite part of each chromosome in those blastomeres of *Ascaris* which are to develop into soma cells, but we have no satisfactory understanding of the formation of vegetative chromidia in the germ cells of *Metazoa*. Yolk nuclei are well known. They seem to be somewhat comparable to vegetative chromidia, but their formation seems generally to have a positive value comparable to the formation of zymogen granules in metazoan gland cells, and of the chromatin spherules in *Opalina*, all bring connected with the manufacture of nntritive substances, in the cytoplasm. On the other hand, the degenerating residual chromatin in the germinal vesicles of many *Metazoa* seems more strictly comparable to vegetative chromidia. There is in *Protozoa* a somewhat similar formation of vegetative chromidia which degenerate before sexual union (chromatin spheres of *Opalina*, vegetative chromidia in many *Plasmodroma*), the result of the process being to free the generative nuclei from the nutritive chromatin which seems in some way to be an obstruction to the sexual process.

Reduction.

In the *Metazoa* the ripening divisions in ovogenesis and spermatogenesis are accompanied by a rednction of the number of the chromosomes. Phenomena of this sort have been described in maturing Protozoan cells; by Schaudinn (1904) and v. Prowazek (1905) for Trypanosomes and by Prandtl (1905 and 1906) for *Didinium*. The phenomena in *Paramaecium* are not quite clear, but Calkins & Cull (1907) interpret them as involving reduction. The accuracy of the observations of Schaudinn and v. Prowazek on Trypanosomes has recently been questioned by Salvin-Moore & Breinl (1907), though it is difficult to see upon what grounds, since they did not stndy the species or stages in which the phenomena were described as occnring. Dr. M. Hartmann tells me that Schaudinn's further work,

soon to be published by v. Prowazek, leaves no doubt of the existence of redniction in Trypanosomes. Several as yet unpnblished papers by Hartmann and his students show reduction divisiou in *Amoeba* and *Flagellata*. In *Opalina* we find clearly a reduced number of chromosomes in the gametes, and it is easy to see that the usual full number is restored by copulation. I have not found how the reduction is effected, but that it occurs is beyond doubt.

It is interesting to note that the diminished number of chromosomes appears long before copulation, in animals from four to eight times too large for encystment. Four chromosomes are found in the nuclei for at least four generations before copulation, and probably for a still longer period. It is impossible to say how many times the animals divide after leaving the cysts before they are ready for copulation. It is possible that for a time the appearance of fewer chromosomes is due to their bivalence.[1] If the smaller number is dne from the first to true reduction division, and apparently this is true, we have the interesting fact that the condition with a reduced number of chromosomes persists for several generatious. In *Metazoa* fertilization immediately follows the maturation divisions.

Neresheimer (1907) has compared the extrusion of the two chromatin spheres in *Opalina* to the formation of the two polar bodies in *Metazoa*, a comparison which seems wholly unjustified.[2] The chromatin spheres neither of them consist of whole chromosomes, but, like the chromatin spherules, are formed from chromatin given off from all the chromosomes. In some nuclei in which the chromatin spheres are present one sees eight chromosomes remaiuing in the nucleus, in other cases four chromosomes are found, showing that the formation of these spheres may occur before the number, of chromosomes is diminished and that it is a process distinct from that by which the diminished number of chromosomes is brought about. As a further objection to Neresheimer's interpretation of the chromatin spheres, which he seems to have based only upon their number and

[1]) In the preliminary notice of this work (Metcalf 1907*a*) I wrote "These chromosomes [of reduced nnmber], as seen in the living animals, show abont half as many granules as do the chromosomes of the full grown individnals". Further stndy of carefully stained material in all stages of the spring phenomena is necessary before fnrther treatment of this interesting point will be profitable.

[2]) Neresheimer had already described a series of phenomena which would necessitate the nnclei at this stage being interpreted as pnrely generative nuclei formed from generative chromidia, which prevented his interpreting the chromatin spheres as vegetative chromidia.

their extrnsion from the nuclei, is the fact that we often find three of these spheres, and that very likely but one is formed in some cases. When only one is seen, it may be, of course, that another was present bnt has already heen extruded.

It may be well to note, hefore leaving this suhject, that, in *Opalina*, each nnclear division is associated which a division of the cell. The phenomena in *Paramaecium* seem less primitive, two cell-divisions heing suppressed during maturation, and as a consequence three nnclei in each gamete degenerating. In *Opalina* all the cells produced by the divisions preceeding copulation are functional gametes as in the spermatogenesis of *Metazoa*. Douhtless the conditions in the matnration of the eggs of *Metazoa* and in *Paramaecium* are secondary.

Relationships of Opalina.

There seems no ground for douhtiug the close relationship of the several species of *Opalina*. Possihly the binucleated species should be placed in one genus and the multinucleated species in another genns. The character of the nuclei, as well as their number, is somewhat different in the two groups. It seems, however, better to retain the genus as at present constituted and to recognise the hinucleated species as a rather distinct subgenus.

The connection of *Opalina* with the *Ciliata* has recently been qnestioned hy NERESHEIMER (1906 and 1907) who concludes, on the basis of the method of reproduction hy gametes, that *Opalina* is more nearly related to the *Plasmodroma* than to the *Ciliophora*. I find myself unahle to agree with this suggestion. The cilia with their hasal granules, and the manner of the arrangement of the cilia in spiral rows, so exactly agree with what we see in *Ciliata*, and these organs are so highly developed, that their independent origin in two distantly related groups should not he assnmed without convincing evidence. The resemblance between the excretory organs in *Opalina* and *Hoplitophrya* suggests relationship, and the excretory organ of *Pycnothrix monocystoides* (SCHUBOTZ 1908) shows still closer resemblance. The presence of a macronucleus containing refractive spherules in *Hoplitophrya* makes this form a good transition hetween *Opalina* and other *Ciliata*. The freqnent fragmentation of the macronucleus in *Hoplitophrya*, without connection with conjugation, is again a character somewhat intermediate hetween higher *Ciliata* and *Opalina* in which chromatin spherules are formed in the nucleus during each mitosis and are dissolved and extruded into the cytoplasm.

On the other hand the restriction of sexnal phenomena in *Opalina* to one period of the year is qnite different from what we find in most *Ciliata*. This is probably associated in some way with its parasitic habit.

The gametes are trne ciliates with characteristic basal granules upon their cilia. They are not formed during encystment, or in great numbers simultaneously from one individnal, as is so usual among *Plasmodroma*. They result from ordinary, though very rapid, division. They differ in no very decided manner from the individuals of the asexual generation, though the microgametes do show special adaptation in the naked sticky tail. The posterior end of *O. saturnalis* in the asexual generation is naked, so this character in the microgametes is not so much of a departure from the usual conditions.

The formation of large numbers of minute individnals in the spring, and their encystment and extrusion from the rectnm of the host into the water, is donbtless an adaptation to the fact that the most favorable time for infecting new hosts is a brief one in the spring while the adnlt frogs and toads are found almost exclusively in the water, and while the vegetarian tadpoles are browsing over the bottom of the ponds where the cysts lie. As my experiments have shown, adult frogs can be infected by *Opalina* cysts, but the feeding habits of the adult are such that infection of this sort must be very infrequent. Infection of the tadpoles, on the other hand, is very easy.

The period of very rapid division in *Opalina* is followed by sexual union, as is usual among *Ciliata*, the restriction of copulation to the spring being probably due to the occurrence of such rapid divisions only in the spring.

The formation of microgametes is by no means nnknown among the *Ciliata* — witness the Vorticellas. In the Vorticellas we also find complete fusion of the gametes.

The resemblance between the reproductive processes in *Opalina* and those in *Plasmodroma* seems superficial, the gametes in *Opalina* being true ciliates and the chief peculiarity being the restriction, for ecologic reasons, of the period of rapid division and copulation to a brief time in the spring, and the consequent false appearance of distinct asexual and sexual generations. There is no true alternation of generations in *Opalina*, any more than there is in Paramaecium.

The qnestion as to whether *Opalina* is a primitive or a highly modified genus of the *Ciliata* also needs considering. Its parasitic

habit does not argue against its primitive nature. The secluded habitat of parasitic life, like that of deep sea life, has enabled many species to retain lowly character without extermination. The question of the primitive or secondary character of *Opalina* must be studied therefore chiefly through an examination of the structure of the animal itself in comparison with other forms.

In its cilia *Opalina* in as highly developed as most holotrichous *Ciliata*. The absence of a gullet seems probably secondary, an adaptation to parasitism, since it uses predigested dialyzable food from the rectum of its host and has no need of ingesting solid food. Even *Mastigophora*, which are doubtless more primitive than *Opalina*, have a gullet which is functionally comparable with that of *Ciliata*. Those species of parasitic *Ciliata* which retain the mouth have probably adopted the parasitic habit more recently than *Opalina*. *Chromidina elegans*, which in certain conditions of its nuclei resembles the multinucleated *Opalinae*, has what has been interpreted as a vestigial mouth GONDER (1905). So also has *Anoplophrya brasili* (LÉGER & DUBOSCQ 1904*b*). LANG (1901) classes *Opalina* with the *Hymenostomidae* among the *Ciliata holotricha*, describing the suborder *Hymenostomidae* as possessing an undulating membrane and as having the mouth always open. Of course *Opalina* has neither undulating membrane nor mouth, yet LANG's phrase, "mouth always open", suggests a very interesting interpretation, which, however, he doubtless did not intend, namely, that the mouth (ingestion tube) of *Opalina* has disappeared by becoming shallower until finally it has joined the even contour of the outer surface of the body, being no longer distinguishable from the latter. This seems not at all unlikely in view of GONDER's description of the mouth of *Chromidina* as a shallow pit over whose walls run rows of cilia continuous with and similar to those on the surface of the body, and also in view of LÉGER & DUBOSCQ's description of a vestigial mouth in *Anoplophrya brasili*.

The presence of functional vegetative and reproductive chromatin in the same nucleus in *Opalina* seems surely more primitive than their segregation in separate nuclei in higher *Ciliata*. In *Opalina*, spherules of vegetative chromatin are formed in the nucleus, are then dissolved and pass into the cytoplasm, where very likely they take part in forming the refractive spherules. In *Hoplitophrya* the functional vegetative chromatin is in a macronucleus distinct from the micronucleus. In this macronucleus refractive spherules are formed. (This process has not yet been described, Text Fig. VIII,

page 270, shows the refractive spherules in the macronncleus and in the gronps of granules into which it fragments.) In higher *Ciliata* distinct vegetative and reproductive nuclei are present. but there are bnt few indications that the refractive spherules in the cytoplasm, are formed by the macronucleus. Each nnclens of *Opalina* is functionally comparably to both micronucleus and macronucleus of higher *Ciliata*, and is in much more primitive condition.

The formation of chromatin spheres in *Opalina* and their extrnsion from the nncleus before copulation seems comparable to the formation of vegetative chromidia in *Plasmodroma* and is probably primitive. The degeneration of the macronuclens in higher *Ciliata* is probably somewhat comparable.

The conditions of maturation in *Opalina* seem simpler than those in higher *Ciliata*. In the maturation of higher *Ciliata* the nuclear divisions unaccompanied by cell-division have generally been discussed from the standpoint of cytophysiology or of the mechanism of heredity.[1]) The conditions in *Opalina* seem to indicate that the degeneration of the nuclei in maturing *Paramaecium* and other higher *Ciliata* is secondary and is connected with the suppression of two divisions of the cell body. In *Opalina* there is no such suppression of divison of the cell body and there is no degeneration of nuclei or cells in connection with maturation. In the division of the macrogamete mother-cells in *Opalina* both daughter cells become functional gametes; similar relations obtain in the formation of Opalina's microgametes. In *Paramaecium* three of the four nuclei (that is three of the four daughter cells) resulting from the maturation divisions in the similar gametes degenerate. In *Metazoa* spermatogenesis follows the type found in *Opalina*, maturation producing four functional gametes, but in the maturation of the eggs of *Metazoa* usually one functional gamete and three degenerate gametes (polar bodies) arise. The fact that the polar bodies are capable of fertilization and development (*cf.* Francotte 1897) seems to show beyond doubt that the usual interpretation of the polar bodies as degenerate gametes is correct.

Complete fusion of the gametes as in *Opalina* and the Vorticellas is doubtless more primitive than such temporary partial union. with exchange of parts of the nuclear material, as we see in *Paramaecium*.

[1]) Boveri (1892 *b*) is the only one, so far as I know, who has discussed the phenomena of matnration in *Ciliata* from the comparative morphological point of view and has recognised that the two maturation divisions here, as in the maturation of the eggs of *Metazoa*, give rise to rudimentary individuals.

Usually in higher *Ciliata* the conjugating individuals are nearly or exactly equal in size. It might seem that *Opalina*, having gametes of unequal size, is in this regard less primitive, but the fact that in the Vorticellas, whose gametes completely fuse, the gametes are often very unequal in size, and also the conditions in *Opalina*, argue in favor of a belief that anisogametes are for the *Ciliata* more primitive than isogametes. Calkins & Cull reach a similar conclnsion. They say (1907, p. 405). "There is little evidence to indicate the lines of evolution that have been followed in the development of the participants in conjugation. The view that is usually adopted, without supporting evidence, is that the isogamous type like that of *Paramaecium*, was primitive and has developed into an anisogamous type with sexually differentiated gametes (e. g. Hartog 1906). It is our belief that the reverse has been the case and that the *Paramaecium* type of conjugation has arisen from a type with sexually differentiated gametes, with intermediate stages in forms like the *Vorticellidae*, where the size difference is great in *Lagenophrys ampulla*, less marked in *Epistylis*, and still less in *Vorticella*; and in *Trachylinidae*, where in *Lionotus fasciotas* the two organisms are alike save for a slight difference in size (Calkins 1902). In the *Vorticellidae* the macrogamete fuses with the microgamete and there is no mutual fertilization, but in *Paramaecium* and probably in *Lionotus*, mutual fertilization takes place. The case of *Lionotus* is to be interpreted as a reminiscence of anisogamy, and we would expect in this case, that the smaller conjugant, if fertilized, would have a reduced vitality. In *Paramaecium*, finally, there is no morphological evidence of the relation to an earlier anisogamous condition, but there is well-marked physiological evidence in the lesser vitality of one of the ex-conjugants, apparent in 72 % of all conjugations in which the history of both was followed (Cull 1907)." We can, I think, at least say that its anisogamous and slightly heterogamous copulation does not argue strongly, if at all, against the comparatively primitive character of *Opalina*.[1])

Finally the character of the excretory organs in *Opalina* — merely enlarged and confluent vacuoles of the ordinary cytoplasmic

[1]) The very interesting *Pycnothrix monocystoides* described by Schubotz (1908), which is apparently a holotrochous Ciliate, seems to have uneqnal gametes, bnt the exact systematic position of this remarkable form cannot be determined until its life history is more fully known, so that we cannot now say whither its condition argues in favor of the primitive natnre of anisogamy for the *Ciliata*, or not.

foam — is very lowly. As parasitic life does not seem in general to produce degeneration of the excretory organs, the lowly character of the excretory organs of *Opalina* is probably primitive. Their resemblance to the excretory organs of *Hoplitophrya* argues for the relationship of the two genera.

It seems, therefore that *Opalina* is a member of the *Ciliata* and that in many respects it is quite primitive.

Léger and Duboscq (1904 *b*) suggest that, because of its habitat in a *marine* fish, *O. saturnalis* is probably the most primitive *Opalina* known, all others being parasitic in terrestrial or freshwater forms. I have suggested above that the restriction of the rapid division and subsequent conjugation in *Opalina* to a brief time in the spring is an adaption to the habits of its hosts. It would be interesting to know of *O. saturnalis* 1) if it shows a similar restricted period of rapid division followed by conjugation, and 2) if the habits of *Box boops* are such as to make such a restriction in the rapid reproduction period of its parasite a decided advantage. If the habits of *Box boops* are not such as to render infection much more easy at one period, and if, in spite of this fact, *O. saturnalis* still has a restricted period of rapid reproduction, then probably the adoption of *Box boops* as a host is recent, *O. saturnalis* showing a peculiarity in its reproduction, which was originally adopted in adaptation to conditions such as we find among the *Amphibia*. I do not know the habits of *Box boops*. Léger & Dubosq found the cysts of *O. saturnalis* in the month of September, but do not say whether they are found only at that season. We must, therefore, leave unanswered this interesting question as to the comparatively recent adoption of *Box boops* as a host for *Opalina*.

It seems probable that the Opalinas were originally uninucleated, that the binucleated condition was brought about by the suppression of one division of the body when the nucleus divided, and that the multinucleated condition is still more secondary bring due to further suppression of divisions of the body. In Text Fig. II, page 206, I have grouped the several species of *Opalina* in three groups which seem to me to indicate their probable relationship: group 1) binucleated species, all circular in cross section; group 2) multinucleated species, circular in cross section; group 3) multinucleated flattened species. Compare also the list of species on page 207 in which the same arrangement is followed. *Opalina ranarum*, the form which has been most studied, is probably one of the most highly modified species.

Léger & Duboscq (1904 a) separate the family *Opalinae*, including the genera *Opalina*, *Opalinopsis*, and *Foettingeria*, from the *Anoplophryinae* including the genera *Anoplophrya* and *Hoplitophrya*; a classification which seems reasonable. Instead, however, of believing with Léger & Duboscq that the resemblance between these two families is a superficial one due to convergence cansed by parasitism, I think that the two families show real, though not close relationship, the *Anoplophryinae* being the nearest relatives of the *Opalinidae*, unless Schubotz' new *Pycnothrix monocystoides* stands still nearer. The difference between the two groups, is, however, probably too great to allow them with propriety to be placed in the same family, *Opalinidae*, as is usnal. The absence of a distinct macronucleus in the *Opalininae* is the chief distinction between this family and other *Ciliata*; but, as I have shown, the distinction is not a fundamental one, the macronnclear elements being present in the nuclei of *Opalina*.

Abnormalities.

Some very interesting abnormal phenomena have been observed in the course of the work described in the previous pages. Brief reference shonld be made to some of these.

Under unfavorable conditions the animals enter on changes which in some respects resemble the phenomena preceeding or accompanying sexnal reproduction. We have already noted that rearing *Opalinae* outside the host tends to make them divide. Even in the fall, when division is very infrequent in freshly taken material, it is fonnd qnite readily among animals that have been kept from one to three days in cultures. This recalls the fact that in the spring, when the period of sexnal reproduction is approaching, division becomes much more rapid.

The major part of the chromatin in the nuclei of animals kept long in cultures tends to aggregate into compact masses (Pl. XXI, Fig. 94, lower nucleus of Fig. 95). This drawing together of the chromatin may go so far as to form a single ball. These phenomena recall the gathering of the vegetative chromatin into two masses before encystment, previons to their extrusion into the cytoplasm. R. Hertwig (1898) has shown that in starved individuals of *Actinosphaerium* the chromatin condenses into a single mass, while

in richly fed animals it is divided into fine granules scattered through the nucleus. In one case I found in the rectum of a *Hyla viridis* only six individuals of *O. obtrigona* all of which were abnormal, showing in their degenerating nuclei preliminary phenomena which very closely parallel the phenomena accompanying extrusion of the vegetative chromatin in normal animals at the time of formation of the infection cysts (Figs. 99—118, Pl. XXI).

Although keeping *Opalinae* outside the host tends to instigate division, life under the unfavorable conditions in the cultures tends to so weaken the animals that they generally do not succeed in completing the divisions. Division seems normally to be aided by the cilia, the swimming movements of the daughter animals tending to draw them apart. The cilia beat less vigorously in the animals weakened by life in the cultures, and, perhaps chiefly on this account, division is rarely completed. In animals which have thus failed to complete their division, the nuclei are very often almost completely divided so that four daughter nuclei are present, bound together in pairs by their connecting threads. Frequently one sees bnt one of the danghter nuclei of the anterior parent nucleus in one cell, the other daughter of the anterior nucleus remaining in the other cell along with the two daughters of the posterior nucleus, so that this cell contains three nuclei, two united to each other by a thread and a third united by a thread to the single nucleus in the other cell (Fig. 98, Pl. XXI). In nine such instances I have seen the odd nuclens in the trinucleated daughter cell either already fused with or in the process of fusing with the anterior of the two nuclei which properly belong to the cell. This recalls the fusion of nnclei in the zygote.

In material of *O. intestinalis* and *O. caudata* one finds, rarely during the fall and early winter, and a little more frequently in early spring, individuals with single nnclei of very large size (Figs. 92, Pl. XX; 96, Pl. XXI). In the character of their mitotic spindle and in the distribution of their chromatin these hnge nuclei very closely resemble the large dividing syncaria in the zygotes in the tadpole (*cf.* Figs. 222, 224, Pl. XXV). The apparently abnormal uninucleated forms are found in freshly taken material. I have no evidence as to the mode of their origin or their relation to normal nuclei. They may possibly be compound nuclei resulting from the union of two nuclei, or from the failure of a nucleus to divide.

The very thick, stocky individuals of *O. caudata* often seen in the spring, have been described [1]) (Fig. 88, Pl. XX). They may be

[1]) page 250.

abnormal, though there is little to indicate that they are so. With them are often found clearly abnormal forms. Fig. 89 shows one such very stocky individual of *O. caudata* which had four nuclei each in a telophase stage of division. Two of these are seen in the figure in end view and so do not show that they are in mitosis. Fig. 90 shows an individual whose two nuclei have almost completely degenerated. I have found one individual of *O. intestinalis* with absolutely no trace of a nucleus. These were clearly pathologic forms and not in any way comparable to the non-nucleated individuals of *Actinosphaerium*, which Hertwig (1899) describes as reforming their nuclei from chromidia. Fig. 91 shows an *O. caudata* whose two nuclei are in a condition characteristic of multinucleated *Opalinae*, but very rare and I think abnormal in *O. caudata*. I have never found nuclei of this sort in *O. intestinalis*.

In one lot of material of *O. intestinalis* from a fifty-four hour infection there were many individuals showing abnormal divisions similar to what Cohn has described for the same species as budding [1]) (Figs. 228—235, Pl. XXV). When first seen these animals falsely seem to be zygotes in which fusion of the gametes is not yet complete. All the animals in this culture died within an hour. Fig. 229 shows an individual just hatched from the cyst which lies collapsed near by. The little spine-like tip of the body shown in Fig. 230 suggests that this individual was an imperfect microgamete (*cf.* Figs. 163, Pl. XXIII; 261, Pl. XXVI).

The abnormal nuclei in the six degenerating individuals of *O. obtrigona*, referred to above, were very interesting and deserve further description. Figs. 99—101, Pl. XXI, recall some of Löwenthal's figures of nuclei of cysts of *O. ranarum* (Text Fig. X, *b*, page 280). Similar nuclei are quite usual in the full-grown forms of the multinucleated species, as well as in their cysts. The chromatin is fonnd in two conditions 1) in a fine superficial net which slight nodal thickenings, this is hardly distinguishable from the acrhomatic foam; and 2) in from two to six, or more, large disc-shaped or hemispherical masses pressed close to the nuclear membrane. Figs. 102 and 103 show somewhat similar superficial chromatin masses in which the chromatin is in the form of a darkly stained network with much lighter meshes. The difference in the appearance in the two sorts of chromatin discs in probably not wholly due to difference in staining. Very heavy staining and long

[1]) Cohn 1904, Figs. 14 and 15.

extraction of the stain seems always to bring out the netted appearance in some of the discs (generally the larger and thinner ones) and not in others which seem more nearly normal. In Fig. 102 and 103 each nucleus is seen to contain a central mass of granules whose later behaviour indicates that they are probably chiefly achromatic. Fig. 105 shows a radiate arrangement of these achromatic granules, the chromatin having gathered into a sphere which shows the characteristic netted appearance. Figs. 106—109 show that there may be one or two of these spheres. When two are in the same nucleus one may be much smaller (Fig. 107, *a*). In many of the figures, especially in Figs. 106 and 107, one sees that the center of each chromatin sphere is filled with a refractive body which does not stain with Delafield's haematoxylin. The chromatin net lies like a cap partially, or almost completely, enclosing this central body. The presence of these referactive bodies in such intimate association with the aggregated chromatin recalls the formation of refractive spherules in the macronucleus or its fragments in *Hoplitophrya* and the possibly similar phenomena in *Loxodes rostrum* (Joseph 1907), and gives a little more probability to the snggestion that in *O. intestinalis* and *O. caudata* the chromatin sphernles after they leave the nuclens and reach the cytoplasm, may aid in the formation of the refractive spherules of the endosarc. Boveri (1907, see his plate XXIII) has described in degenerating nuclei cf disperm Echinoderm larvae compound chromatin and refractive bodies very closely resembling those here described in the degenerating nuclei of *O. obtrigona.*

Figs. 110 to 118 show a very interesting arrangement of the achromatic grannles in the form of two polar groups with lines of grannles connecting them and often with a more or less evident radiate arrangement of the granules aronnd the polar groups. One or two of the netted chromatin spheres lie on the onter side of the granular spindle-fibres, at the eqnator of the spindle. Fig. 110 shows the chromatin sphere still adhering to the nuclear membrane. In Fig. 111 we see the two chromatin spheres withdrawn from the nuclear membrane and lying npon the spindle. The polar groups of granules, and the lines of grannles composing the spindle, at first sight suggest comparison with a mitotic spindle with large polar centrosomes. It seems to me not improbable that they are essentially similar to the strnctures in some protozoan nuclei which have been regarded as spindle and centrosomes. (Compare R. Hertwig 1899, *Paramaecium* micronucleus; Schaudinn 1894, *Amoeba crystalligera*:

Keuten 1895, *Euglena viridis*; Calkins 1901, *Clepsidrina*; Hartmann & v. Prowazek 1907, numerous *Plasmodroma*.)

These are not functional mitotic spindles in these degenerating nuclei of *O. obtrigona*. The nuclei, though they become elliptical, do not divide, but soon go to pieces, leaving spaces in the cytoplasm where they lay (Fig. 118). During the process of degeneration the nuclear membrane becomes fainter and fainter and ultimately entirely disappears. Sometime the chromatin sphere, including both the chromatin net and the central refractive body, is extruded into the cytoplasm, leaving within the degenerating nucleus only one or more masses of debris representing the achromatic structures (Figs. 116 and 117). In other cases one finds the degenerate chromatin sphere lying in the space from which the nucleus has dissappeared.

The chromatin sphere itself resembles those of the cysts (*cf.* Fig. 133, Pl. XXII), and its extrusion is propably comparable to that of the latter. That is, under unfavorable conditions, the degenerating nuclei undertake a part of the activities which usually preceede copulation. I have not found a perfectly clear spindle-like arrangement of the achromatic grannles in the nuclei of the cysts or of the minute individuals in the spring which were preparing to extrude the vegetative chromatin, but most of my material of these forms was stained with acetic-carmine which does not give sharp pictures of the finest details. In sections of cysts stained with Delafield's haematoxylin, one sees in the center of the nuclei gronps of granules (Figs. 134, 136—139, Pl. XXII) resembling those in the earlier stages of degeneration in the nuclei of *O. obtrigona* (Figs. 105—109, Pl. XXI). Up to this point the two sets of phenomena, normal and abnormal, seem quite comparable. The granular spindles and polar masses do not seem to be paralleled in the normal nnclei at any stage of the life cycle. Their resemblance, however, to what is found normally in some *Plasmodroma*, e. g. *Amoeba cristalligera*, is such as to suggest that these abnormal phenomena in degenerating nuclei of *O. obtrigona* are a reminiscence of archaic normal conditions.

The abnormal phenomena described in this chapter are probably dne to nnfavorable conditions of life. Their resemblance to some of the phenomena usually preceeding copnlation suggests comparison with the well-known fact that many animals, e. g. *Rotifera*, *Cladocera*, which reproduce asexually under favorable conditions, are induced by unfavorable conditions to introduce sexual phenomena.

Infection Experiments.

Under natural conditions the several species of *Opalina* are found only in certain definite hosts, as noted in the table on page 207. In the hope of reaching a better understanding of this restricted distribution, many artificial infections were made with the cysts of *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. dimidiata* upon the larvae of *Rana esculenta*, *Bufo vulgaris* and *Bombinator pachypus* and upon the adults of several species of frogs and toads and *Triton cristatus*. Attempts were made also to infect the same larvae and some of the same adults with adult *Opalinae* of four species, *O. intestinalis*, *O. caudata*, *O. dimidiata* and *O. obtrigona*.

Opalina intestinalis cysts cause infection of the tadpoles of *Rana esculenta* and *Bufo vulgaris* as readily as of the tadpoles of *Bombinator pachypus*. Under natural conditions *Rana esculenta* only very rarely contains this parasite. It has never been reported from *Bufo vulgaris*. In both of these hosts the *Opalinae* form normal gametes which copulate. After four weeks the infection appeared normal when studied from living material. Preserved material from older infections has not get been examined.

Adult *Hyla arborea* and *Rana temporaria*, as well as tadpoles of the latter species, are also readily infected if forcibly fed with the cysts, the young *Opalinae* in the rectum being apparently entirely normal. The later history of these infections was not followed to see if copulation occurred. *O. intestinalis* has never been reported from *Hyla arborea* or *Rana temporaria*.

Tadpoles of *Bombinator pachypus*, *Bufo vulgaris*, and *Rana esculenta*, when placed with foeces of either species of *Bombinator* containing adult *O. intestinalis*, ingest many of the parasites with the foeces. Many others of the parasites pass into the nostrils with the respiratory current. Many of these ingested adult *Opalinae* are digested by the tadpoles of *Bufo vulgaris*, but some pass uninjured through the whole alimentary canals to the recta and there establish thriving colonies. Tadpoles of *Bombinator pachypus* digest a smaller proportion, and tadpoles of *Rana esculenta* digest almost none of the adult *Opalinae*, their recta becoming very richly infected with large *Opalinae*. There is no subsequent degeneration of the *Opalinae* in any of these infections, at least within four weeks. Adult *Hyla viridis* and adult *Rana temporaria* are also readily infected if forcibly fed with adult *O. intestinalis*.

Attempts to infect two adult individuals of *Triton cristatus* with cysts and adults of *O. intestinalis* failed, possibly because the newts did not swallow the *Opalinae.* The negative result cannot be trusted to show that such infection is difficult to secure. Conte & Vaney report *Opalina intestinalis* from *Triton taeniatus.*

Opalina caudata gave exactly similar results with only the additional fact that adult *Rana esculenta* are abundantly infected from the cysts. Doubtless *O. intestinalis* cysts would infect adult *Rana esculenta,* but no such experiment was made. *Opalina caudata* has never been reported from *Rana esculenta,* nor from *Rana temporaria, Bufo vulgaris,* nor *Hyla viridis.*

Opalina dimidiata cysts cause abundant infection of the tadpoles of *Bufo vulgaris, Rana temporaria* and *Bombinator pachypus.* Adult *O. dimidiata* cause abundant infection in tadpoles of the same species and in tadpoles of *Rana esculenta. Rana esculenta* is the usual host for *O. dimidiata. Bufo vulgaris* is also frequently infected with this species, but it has never been reported from *Rana temporaria.*

Adult *Opalina obtrigona* cause abundant infection of tadpoles of *Bufo vulgaris, Rana esculenta* and *Bombinator pachypus,* though this parasite has never been reported from these species.

Table showing results of infection experiments.

[Asterisks indicate infections different from those known to occur in nature.]

O. intestinalis cysts cause infection of	*Bombinator pachypus* tadpoles.
	Bufo vulgaris tadpoles.*
	" " metamorphosing tadpoles.*
	Rana esculenta tadpoles.
	Rana temporaria tadpoles.*
	" " adult.*
	Hyla viridis adult.*
" " adults* " " "	the same tadpoles and adults.
O. caudata cysts " " "	*Bombinator pachypus* tadpoles.
	Bufo vulgaris tadpoles.*
	" " metamorphosing tadpoles.*
	Rana esculenta tadpoles.*
	" " adult.*
	Rana temporaria tadpoles.*
	" " adult.*
	Hyla viridis adult.*
" " adults* " " "	the same tadpoles as the cysts.

O. dimidiata cysts cause infection of	*Rana esculenta* tadpoles.
	Bufo vulgaris tadpoles.
	Rana temporaria tadpoles.*
	Bombinator pachypus tadpoles.*
„ „ adults* „ „ „	the same tadpoles as the cysts.
O. obtrigona adults* „ „ „	*Bufo vulgaris* tadpoles.*
	Rana esculenta tadpoles.*
	Bombinator pachypus tadpoles.*

In the preliminary notice of this work there were two errors: 1) adult *Rana esculenta* were infected by cysts of *O. caudata*, not of *O. intestinalis* as there stated; 2) the *Bufo vulgaris* called "young toads" in that paper were not adult, but were metamorphosing tadpoles with fully formed legs, with the tails only beginning to diminish, and with months of the larval type.

In the light of the results of these infection experiments, the restricted distribution of the parasites in the several hosts is very difficnlt to understand. It seems probable that any species of frog or toad can be infected by cysts or adults of any species of *Opalina* (except, of course, *O. saturnalis*). Why, then, is the distribution of the parasites so restricted? Why, for example, do not *O. dimidiata*, *O. intestinalis* and *O. caudata* all naturally occur in both *Rana esculenta* and *Bombinator pachypus*? The tadpoles of *Rana esculenta* and *Bombinator pachypus* live together in the same ponds and streams. Why does one species become infected only with *O. dimidiata* and the other species only with *O. intestinalis* and *O. caudata*, when all three kinds of cysts are present in the same ponds at the same time of year and must donbtless often be ingested by both species of tadpoles? The question deserves more attention than I had time to give it last spring. If, upon my return to America, I find conditions there favorable for experiment upon this point, I shall study it further. I hope also the matter will be further studied upon Europaean forms, the species mentioned above being especially favorable for study.

A Description of *Opalina zelleri*, Neresheimer.

In his fine paper upon the Opalinas, published in 1877, Zeller describes finding, along with *O. dimidiata*, in the rectnm of *Rana esculenta*, certain individuals much more stocky than the ordinary *O. dimidiata*. They were especially characterized by having the body folded posteriorly, with deep furrows between the folds, ordinary

Opalinae dimidiatae having the posterior end of the body pointed. Zeller was uncertain whether to regard these stocky individuals as *Opalinae dimidiatae* of a peculiar form, or as belonging to a new species.

Delage & Herouard (1896), without having seen these Opalinas, interpreted Zeller's figure as indicating the presence of vestigial excretory organs, an interpretation which I have shown to be mistaken (Metcalf 1908 *b*).

Neresheimer (1907) again found these peculiar *Opalinae* in *Rana esculenta*, and, without adding to Zeller's description, gave them the name *O. zelleri*, believing them to belong to a distinct species.

In the same year I independently (but later) gave them the same name, it being only natural to name them after their discoverer.

I have seen these forms but twice, Zeller apparently saw them several times, thongh he does not say definitely. In both instances when I saw them they were with *Opalinae* which undoubtly belonged to the species *dimidiata*. Zeller reports the two forms as occuring together. Neresheimer does not say how often he saw these peculiar forms, or whether *O. dimidiata* was present with them. All the *Opalinae zelleri* I have seen were large, all the small individuals present with them, as well as many of the large ones, being typical *O. dimidiata*. The fact that very much swollen and stocky individuals of *O. caudata* are frequent in the late winter and in the spring, and the fact that I once fonnd a few very thick individuals of *O. ranarum*, make one suspect that the forms called *zelleri* may be merely similar stocky individuals of *O. dimidiata*. Until this question can be definitely settled, it is convenient, and is apparently justifiable, to give these forms a specific name.

Opalina zelleri (Text Fig. II, p. 206) is the largest Opalina known, when we consider its breadth and thickness as well as its length. A large example has a length of 0.25 mm and a breadth of 0.13 mm. In cross section the animal is circular except that there are present upon the body four to eight longitudinal ridges with intervening furrows, which show, of course, in cross section. The anterior end oı the body is bent to one side, as in all other Opalinas. The animal is, however, so stocky that the bend is not quite so noticeable as iu slenderer forms. In *O. ranarum* the correspouding bend in the body is present, but the decided flattening of the body, and its consequent great breadth, somewhat obscure the bend. The anterior end of

O. zelleri is slightly compressed to the form of a very thick wedge. If this compression could be carried much further until the whole body was thin and flat, its anterior end, and indeed its whole form, would resemble that of *O. ranarum*, for frequently *O. ranarum* has the contour of the posterior end of the body concave.

At the posterior end of the body the longitudinal ridges show rounded ends, there being a terminal depression of considerable depth between their posterior ends. *O. dimidiata* is pointed posteriorly, often very sharply pointed and slender, differing most markedly from *O. zelleri*. It was the superficial furrows between the ridges at the posterior end of the body, rather poorly drawn by Zeller, which Delage & Herouard interpreted as internal canals, remnants of a system of water canals.

The broad rounded longitudinal ridges are usually five or six in number, though one finds individuals showing four or eight ridges. They are constant, not changing as the animal swims. They are slightly spiral, following the same general direction as the spiral lines of cilia.

Opalinae of any cylindrical species may often, when living under adverse conditions, show a decided spiral twisting of the body, which is then raised into ridges. These ridges are constant, not changing as the animals swim. They may possibly be, in a general way, comparable to those of *O. zelleri*.

Always at least one and often two of the longitudinal ridges show at the posterior end a rounded protrusion, giving a more pointed appearance than that of the other ridges. It is possible that this rounded point marks the morphological posterior end of the body and that when two such points are present they indicate nascent longitudinal division of the body. These points remind one slightly of the short sharp protrusions from the posterior ends of very stocky *Opalinae caudatae* (Fig. 88, Pl. XX), though I have never seen two points upon an animal of the latter species.

The minute structure of *O. zelleri*, as seen in sections, agrees so exactly with that of *O. dimidiata*, as to need no description. The anterior end of the body, as in all other species of *Opalina*, has denser endoplasma and more numerous endosarc spherules than the rest of the body.

This form deserves further study, but it is rare. I found it only twice, once on the 22[d] of June and again on an unrecorded date at about the same time. No cysts were present with the Opalinas in the rectum. Zeller describes its reproduction as like

that of *O. dimidiata*, but it is difficult to see how he knew that the reproductive stages studied belonged to *O. zelleri* and not to *O. dimidiata* which was living in the same host. I have once seen an individual of *O. zelleri* in longitudinal divison, the phenomena being as in *O. dimidiata*.

I have no constant opinion as to the distinctness of *O. zelleri* from *O. dimidiata*.

Chronological Review of the Literature of Opalina.[1])

Opalina was first mentioned by Leeuwenhoek in 1685. In his *Opera omnia* (1722) he quotes the earlier record of finding innumerable *animalculae* of various sizes and forms in the foeces of the frog. One of these figured seems in all probability to have been *O. ranarum* (Text Fig. XII, *B*). Another may have been *O. dimidiata* (Text Fig. XII, *A*) [not *O. intestinalis* as Kent (1881—1882) supposed].[2])



Text Fig. XII.
Leeuwenhoek's figures of *animalculae* from the rectum of frogs: *A* may be *O. dimidiata*; *B* is almost surely *O. ranarum*.

One hundred years later than Leeuwenhoek, Bloch (1782, p. 36, Taf. XXIII) described and figured two forms from the alimentary canal of the frog, which he called *Hirudo intestinalis* and *Chaos intestinalis cordiformis*. The former was probably *O. dimidiata* or

---

[1]) Only papers and books which include observations upon *Opalina*, or discussions based definitely upon conditions in *Opalina*, are included in this review. General discussions which do not especially mention *Opalina* are omitted, so also are most text books which refer but briefly to observations upon *Opalina* made by others than the authors of the books in question. I have endeavored, with these exceptions, to make the review as complete as possible, but doubtless I have failed to find numerous references to the genus. I should cordially appreciate the kindness of any one who would direct my attention to references to *Opalina* not mentioned in this review.

[2]) Throughout this review of the literature my own comments are included within brackets.

O. intestinalis (Text Fig. XIII, *A*). A late stage of division was observed in Bloch's preparations by his friend "*Herr Oberprediger* Herbst" and was interpreted by Bloch as copulation (upper two animals of Text Fig. XIII, *A*). As the animals were united by their pointed ends, these were regarded as posterior and it was assumed that the months must be at the opposite broader ends. The second form, Chaos, may possibly have been *O. ranarum* (Text Fig. XIII, *B* and *C*). Bloch's artist saw many small particles come out of the posterior (?) end of a quiet individual, which soon died, phenomena which Bloch interpreted as the birth of young. [Doubtless the animal was going to pieces.]

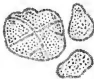


Text Fig. XIII.

Bloch's figures of *Opalina* (?). *A*, three of his nine figures of "*Hirudo intestinalis* (*der Eingeweideblutigel*)". The upper pair [in a late stage of division] show what he interpreted as copulation. *B*, two of his seven figures of "*Chaos intestinalis cordiformis* (*das herzförmige Infusionstierchen*)". *C*, an animal of the same species "giving birth to young". *B* and *C*, probably represent *Balantidium* and not *Opalina*.

Göze (1782, p. 429 - 433, Taf. 34), in the same year, makes a more important contribution to our knowledge of *Opalina*. He says *Chaos* includes several sorts of intestinal worms which are found in the "*Landfrosch*" [*Rana temporaria*], the "*Wasserfrosch*" [*R. esculenta*], the "*Mittelfrosch*" [*Bombinator pachypus?*], in "*Landkröten*" [*Bufo cinereus?*] and "*Wasserkröten*" [*Pelobates fuscus?*]. He says they live naturally in the recta of these amphibia and have not merely wandered in from the water because: 1) they are never found in water; 2) they are found in land-toads as well as in water-toads; 3) they are found only in the anterior end of the rectum, just behind the constriction which separates it from the small intestine, never in the small intestine or in the back part of the rectum; 4) one finds three or four species always of constant shape; 5) if frogs are kept a quarter of a year in water the rectum becomes entirely empty of the animals, and still none of these animals are found in the water, though many other *Infusoria* are present. He says that one finds frogs or toads with either very few or none of the *Chaos* in the recta, that the little animals are more abundant

in April and May; that they decrease in the hot summer months; that in December and January they are entirely absent. On March 22[d] numerous "*Flimmerwalzen*" [apparently *O. intestinalis*], were found in the rectum of the "*Mittelfrosch*" during the winter sleep, but they were not so large as in summer. The "*Flimmerwalzen*" (Text Fig. XIV, *B*) are found only in the "*Mittelfrosch*", never in the "*Landfrosch*" or "*Wasserfrosch*". When magnified 370 diameters they appear 1 inch long and $^1/_{12}$ of an inch broad. On p. 311 he gives the name *Leucophra* to these forms. Certain much larger "*Flimmerquadrate*" [probably *O. ranarum*] are mentioned and figured (Text Fig. XIV, *A*).





Text Fig. XIV.
GOEZE's figures of *Opalina* (?). *A*, three of his eight figures of "*Flimmerquadrate*" [apparently *O. ranarum*]; *B*, a group of "*Flimmerwalzen* (*Leucophra*)" [probably *O. intestinalis* or *O. caudata*] from the rectum of the "*Mittelfrosch*".

[O. F. MÜLLER's (1786) *Leucophra globulifera* thought by EHRENBERG (1821) to have been an *Opalina*, seems clearly not to have belonged to this genus].

SCHRANK (1803) gives a brief description (p. 68) of *Paramaecium incubus*, which he regards as perhaps the same as BLOCH's *Hirudo intestinalis*, which was probably *Opalina intestinalis* or *O. dimidiata*. [His description however seems to apply to *Balantidium entozoon* and not to an *Opalina*.]

[BORY DE ST. VINCENT's (1824) reference to *Leucophra globulifera*, thought by EHRENBERG to apply to *Bursaria [Opalina] ranarum*, is really to a different form, as O. F. MÜLLER's (1786) original description of *Leucophra globulifera* shows.]

EHRENBERG (1831) (p. 110) describes very briefly *Bursaria*

[Opalina] ranarum, and (p. 111) briefly describes *Bursaria intestinalis* [which according to his description cannot be an *Opalina*].

Ehrenberg (1835, p. 164) in a discussion of the "male gland" of *Protozoa*, says that that of *Bursaria [Opalina] ranarum* is band-shaped or has a "*Seidenschnurform*".

Purkinje & Valentin (1835) mention a form which they believed may perhaps be the same as Ehrenberg's *Bursaria ranarum*. To this form they give the name *Opalina ranarum*, the first use of the name *Opalina*. "*Propter colorum superficei splendorum et varietatem sub sole pleno adparentem Opalinam eam vocavimus.*"

Von Siebold, in 1835, mentions the occurrence in the spring in *Rana temporaria* of a great number of completely ciliated, light gray animalcula, and refers to the regularly undulating stripes over the whole body, due, as he [correctly] says, to the serial wave-like movement of the cilia. [The reference is clearly to *O. ranarum*.]

Ehrenberg (1838) gives drawings of his *Bursaria intestinalis*[1] and *B. ranarum*, which beyond doubt are respectively of *O. intestinalis* and *O. ranarum*. His description of the former species shows that he confused with it *O. dimidiata*. He says it is abundant in February, near Berlin, in *Bufo cinereus*, *Rana temporaria* [incorrect] and *R. esculenta*. The nucleus is called a male gland, and a mouth is [of course erroneously] described as present at the pointed [posterior] end of the body. Numerous digestive vacuoles [probably nuclei of *O. dimidiata*] are described. The same interpretation is given to the nuclei of *Bursaria* [*Opalina*] *ranarum*. The abundant refractive spherules of both species are called egg-granules. Transverse division of *O. intestinalis* is mentioned and figured. *Bursaria* [*Opalina*] *ranarum* is decribed as large, flat, with 32—33 longitudinal rows of cilia; a mouth is described at the pointed anterior end, and an anus at the broad posterior end; a small curved male gland is also described. Neither species was found to ingest pigment granules given to it, so the position of the egestion opening was only donbtfully identified. [Of course *Opalina* has neither mouth nor anus.] The dimensions of *B. intestinalis* are given as: length $^1/_{240}$—$^1/_{120}$ of an inch, diameter of the eggs $^1/_{4000}$ of an inch; of *B. ranarum*, length $^1/_{256}$—$^1/_{72}$ of an inch. Ehrenberg's figures give the first entirely certain identification of any species of *Opalina*, there being no doubt as to the species from which they were made, but *O. intestinalis*, though well

[1]) He makes no reference to his previous description of *Bursaria intestinalis* (1831) which does not apply to any *Opalina*.

figured, is not distinguished in the description from *O. dimidiata* [which has the same shape but contains many nuclei].

DUJARDIN (1841) makes very brief reference to the Opalinas, giving an unrecognisable figure [probably not of an *Opalina*].

MAX SCHULTZE (1851) says (p. 68) that it seems to him very probable that the Opalinas form no true independent genus, but are rather developmental stages or nurses ("*Entwicklungsstufen oder Ammen*") of other animals. [The word *Ammen* is difficult to understand in this connection.] He notes (p. 69) the absence of a contractile vacuole in *O. ranarum*.

PERTY (1852) correctly describes the form of *O. ranarum* from the alimentary canal of *Rana temporaria*. He says that the mouth and body cavity are scarcely recognisable; that the whole surface in life seems evenly ciliated, and that the longitudinal striation in dead individuals is due to delicate folds, not to cilia. The appearance of the waves of motion of the cilia is aptly compared to that of the waves which pass across a wheat field in the wind. No figures are given. *Bursaria* [*Opalina*] *intestinalis* is mentioned but not described.

STEIN (1856) mentions (p. 56) *O. ranarum* and also suggests that *Bursaria intestinalis* may be an *Opalina*. On p. 37 he diagnoses the genus *Opalina* (in the broader sense) saying that the cilia are in rows over the whole surface of the body, that these animals are distinct from all other Infusoria in having no mouth and therefore taking their nourishment in liquid form through the whole surface of the body; in having for the most part no contractile water vacuole; and in being often without nucleus. He considers it doubtful whether they are to be regarded as true *Infusoria*, or as developmental stages of endoparasitic worms. They are said to reproduce almost always by transverse division. *O. ranarum* is said to be most divergent from other ciliate *Infusoria* since it has no nucleus or contractile vacuole and has never been seen in division.

LEYDIG (1857) doubts the position of the Opalinas as *Infusoria* arguing from the many nuclei of the multinucleated forms and from the "beautifully cellular structure" of the outer plasma of *O. intestinalis* that they may be multicellular forms.

PAGENSTECHER (1857) regards *Opalina* as probably a stage in the development of a Trematode. He figures a form which seems to be *O. ranarum*.

KÜHNE (1859, p. 823) stimulated *Opalina* (species not mentioned) and other *Ciliata* with strong induction electric currents and saw

vigorous movements arise, followed by protrusions from the body as if it were broken, and finally the body became completely flat. "With moderate currents, at the first stimulation the animals drew back strongly, then lay entirely quiet in a sort of tetanus of all the muscles, if they were not carried forward by the action of the cilia, upon which the current seemed to have absolutely no influence." If the stimulus was strengthened, constrictions soon appeared and then breaks at different places at the edge of the body. In this condition many animals swam about for a considerable time if the stimulus was removed. After long stimulation with very strong currents the whole animal liquefied, forming a shapless flat mass (*"unförmigen Brei"*) in which for a long time the cilia here and there would continue moving.

Stein (1859) mentions (p. 72) *Opalina* as belonging to the holotrichous *Infusoria*; he again refers (p. 75) to the divergence of this genus from the rest of the *Infusoria* in its lack of mouth and anus and in absorbing liquid food through the surface of the body: he describes (p. 91) the presence of many vacuoles with definite contour, filled with liquid containing granules. [This reference is apparently to the nuclei.] Division or budding had not up to that time been observed in *O. ranarum* (p. 94). He says he had sought in vain for a nucleus in *O. ranarum* (p. 94).

Stein (1860, p. 54) again emphasises the divergence of the Opalinas from the other holotrichous *Infusoria*. He says the former genus *Opalina* divides itself into several genera: *Discophrya* including the forms with a sucking disc at the anterior end of the body; *Hoplitophrya* including the forms bearing horny hooks at the anterior end of the body; *Anoplophrya* including forms, nearly related to *Hoplitophrya* but without discs or hooks, which have simple nuclei in the axis of the body and contractile vacuoles of different forms; and *Opalina* including *O. ranarum*, the form longest known, and *O. dimidiata*,[1]) a nearly related, slenderer, more elongated form. also living in the alimentary canal of the frog. These two species have no contractile vacuoles and no ordinary nuclei, but instead have numerous small nucleus-like structures scattered through the whole parenchyma.

Pritchard (1861) describes at considerable length the *Opalinidae*, giving however but little attention to *O. ranarum* the only true *Opalina* he recognises. He says of *O. ranarum* that the mouth

[1]) I have not found Stein's original description of *O. dimidiata*.

described by EHRENBERG is no true mouth but a mere fold of the surface as may be seen after the body has been distended by adding a little dilute solution of iodine, alcohol, or acetic acid (STEIN); that no nucleus was found by STEIN; that contractile vacuoles are wanting; that the cilia are disposed in longitudinal lines; that the species is common in the intestine and bladder of frogs; that "the absence of a mouth affords evidence of the merely transitive nature of *Opalinoea*", that "these simple beings are not independent but the mere embryonie or transitional phases of other animals", that "they are probably larvae of various worms", "consequently this group of beings is at best but provisional, serving only the purposes of definition and nomenclature"; that „neither the intimate structure nor the developmental history of the *Opalinoea* is sufficiently well understood for them to be arranged in well-defined genera; that *O. tritonis* (PERTY) "is very like *O. ranarum* and requires further examination"; that *O. nucleus*, *O. entozoon* and *O. intestinalis* „... are nothing more than different phases of growth and development of *Opalina ranarum*". Two unnamed and unrecognisable figures are given.

KÖLLIKER (1864, p. 24) recognises the many nuclei of *O. ranarum* as true nuclei and for the first time mentions the cysts, which he describes as multinucleated. He regards the cysts as eggs, and thinks that the fact that *Opalina* develops from eggs confirms MAX SCHULTZE's view that they are developmental stages of *metazoa*.

QUENNERSTEDT (1865) discusses the organization of the *Infusoria*, making but brief reference to *Opalina*. In his description of species he treats *O. ranarum*, giving fairly good figures.

STEIN (1867) opposes (p. 10) LEYDIG's belief that the Opalinas are multicellular, saying that *O. intestinalis* is clearly not so, and that the numerous clear vesicles of *O. ranarum*, *O. dimidiata* and *O. obtrigona*, which are demonstrated with acetic or chromic acid, are not nuclei, but are vacuoles of liquid containing granules. The structure of the *Opalinae* therefore, does not confirm belief in the multicellular nature of the *Protozoa*. The binucleated Opalinas are classed as numbers of his genus *Anoplophrya*. On p. 311 brief reference to the synonomy and occurrence of these forms is made.

CLAPARÈDE & LACHMANN (1868, p. 373) class the *Opalinae*, with many of the other forms now placed as members of the family *Opalinidae*, as an appendage to the ciliate *Infusoria*.

LANKESTER (1870) excludes from the genus the forms now called *Opalina*, reserving this name for the species "so frequently found in

both marine and frish-water Annelids". He says "the simple structureless body of these first named parasites has really very little in common with Opalina, properly so-called — an abundance of highly refringent granules being the only differentiated portions of its substance, no trace of the nucleus and contracted vesicles, nor of the furrowed cuticle of true Opalina being observable. It is not impossible that these swimming flakes of sarcode — for they are nothing more — may undergo subsequent metamorphosis of the most extreme character."

Engelmann published in Dutch (1875) and in German (1876) the first account of the growth of the young Opalinas in the rectum of the tadpole. He reared tadpoles from the egg in glass dishes. He does not say how they were fed or how they became infected, though he mentions remnants of plants as present in their alimentary canals. [Probably the tadpoles were naturally infected from the material in the dishes in which they were kept, else Engelmann would have mentioned artificially infecting them from the material in the recta of the frogs.] He found uninucleated cysts in the recta of the tadpoles and he also describes stages in the development of the little Opalinas from the uninucleated to the multinucleated condition. [His figures suggest tha the may have seen both micro- and macrogametes, though he did not recognise them as such, or observe copulation. Engelmann says he studied *O. ranarum* from tadpoles of *Rana esculenta*. As this parasite has never before or since been reported from this host it seems possible that cross infected material was studied. The minute Opalinas figured seem clearly to be *O. ranarum*, for many of them are not slender enough for the corresponding stages of *O. dimidiata* [1]), while they resemble Zeller's figures of the minute *O. ranarum* in the tadpoles. His observation of uninucleated cysts suggests either that possibly Engelmann saw encysted zygotes, as Neresheimer thinks, or that infection cysts of *O. intestinalis* or *O. caudata* may have been present also, for uninucleated infection cysts are common only in these two of the Europaean *Opalinae* though they are not rare in *O. ranarum* (cf. p. 281). As the tadpoles were reared from eggs, there can be little doubt of their correct identification, since the time of year when the eggs were found, and their size and color, as well as the size and color of the tadpoles themselves, would distinguish them from

[1]) Neresheimer (1907) thinks that they were *O. dimidiata*, but I have not found the minute individuals of this species presenting this appearance.

those of *Rana temporaria*. In the chapter on infection experiments, page 314, I have shown that cross infections are very easily secured. In view of this fact it seems hardly safe to accept ENGELMANN's report of *O. ranarum* from *Rana esculenta* as surely establishing that that species natnrally occurs in this host.] ENGELMANN's work definitely settled the fact that the nnclei of the multinucleated *Opalinae* are true nuclei. He regards *Anoplophrya* and *Hoplitophrya* as transitional forms between *Opalina* and other *Infusoria*. He sought unsuccessfully to find the manner of origin of the cysts in the rectum of the frog.

ZELLER, the following year (1877) published a very accnrate paper describing for five species (*O. ranarum, O. obtrigona, O. dimidiata, O. intestinalis* and *O. caudata*, n. s.) 1) the rapid transverse and oblique [really longitudinal] divisions in the spring, within the frog's rectum, by which the Opalinas become minnte; 2) the cysts in the rectum of the frog and the process of encystment; 3) the cysts in the rectum of the tadpole; 4) the character of the animals hatched from the cysts; 5) their growth to adult character. Good descriptions of the form and strnctnre of the adults are given. ZELLER is the first to describe the nucleoli and their behaviour in mitosis and gives also the first good description of the disc-shaped refractive spherules. In studying the multinucleated species of *Opalina* he fonnd the cysts in the rectnm of the frog to be multinucleated (usually 4 nuclei); in the recta of the tadpoles he found both multinucleated and uninucleated cysts, the latter with large nuclei, as ENGELMANN described. He figures a minute "abnormal" individual of *O. ranarum* from the rectum of the tadpole [which was probably a microgamete or a microgamete mother-cell (Text Fig. XV), but he did not so interpret it, nor did he observe copulation]. He figured and briefly described a large form occurring with *O. dimidiata* in *Rana esculenta*, which he said might be either a new species or a form of *O. dimidiata*. [NERESHEIMER has since named this form *O. zelleri*.] This, the finest of all the papers upon *Opalina* will long serve as the starting point with all students of the genus.



Text Fig. XV.
ZELLER's figure of a minute *O. ranarum* from a tadpole of *Rana temporaria*. It was possibly a microgamete or a microgamete mother-cell, though the tail bears cilia.

CERTES (1880) discusses the presence of glycogen in the *Infusoria*, either in the form of refractive spherules or in solution in the endo-

plasm. *Opalina* is referred to as agreeing with the other *Infusoria* in never having the glycogen granules in the nuclei.

Balbiani (1881) makes brief reference to observations of Engelmann and of Zeller upon the division of the nuclens in *Opalina*.

Kent (1881—1882) gives good diagnoses of the five species of *Opalina* then known. He quotes Engelmann's and Zeller's descriptions of the phenomena of encystment and the growth of the young animals in the tadpoles. Many of Zeller's and Engelmann's figures are well copied. The hosts of *O. intestinalis* are given as *Pelobates fuscus* and *Rana esculenta* [in both of which it is very rare, its nsual hosts being *Bombinator pachypus* and *B. igneus*].

Krukenberg (1882) in a discussion of digestion refers to *Opalina* among the animals which do not ingest solid food.

De Lannesan (1882) gives a very brief description of *Opalina* and says that the *Opalinae* are donbtless descended from non-parasitic forms which became parasitic and gradually lost month and anus. Brief reference is made to the cysts and to the reproduction.

Stokes (1884) describes *O. flava* n. s., from *Scaphiopus holbrookii*, the Hermit spade-foot Toad of eastern North America.

Nussbaum (1884) a preliminary notice of Nussbaum 1886.

Barfurth (1885) includes *O. ranarum* in a general discussion of glycogen in the bodies of animals. He showed that, when treated with "*Jodgummi*" or with iodine glycerine, some individuals remained merely yellow, others showed in certain restricted areas of the body a red brown color "characteristic of glycogen", the color sometimes being diffuse, sometimes following the lines of the cilia. Under higher magnification irregular masses of glycogen were found staining brown, while near them were many light yellow strongly refractive drops of another snbstance ("fat") [probably the refractive spherules of the endosarc].

Von Kölliker (1885) says (p. 23) that division in multinucleate forms like *Opalina*, which takes place without coöperation of the nuclei, is not comparable to true division among the protozoa, for the fragments do not grow to the size of the parent, bnt continue their division until they become very minute particles comparable to spores. The process may be described as cell-formation without division of the nucleus. [The distinction is superficial, not fundamental. Nuclear division, of course, occurs, but the properly concomitant divisions of the body are for a time suppressed, to appear later, in the spring, when the animals are preparing for encystment.]

Gruber (1885a) in a discussion of multinucleate protozoa, refers briefly to *Opalina*, saying that the fragmentation of the multinucleate Opalinas in the spring, by which a generally uninucleate condition is reached before encystment, is not comparable to ordinary binary fission. [The encepted forms usually have two to four nuclei.]

Gruber (1885*b*) in a discussion of artificial division in infusoria, refers briefly to Nussbaum's (1884) work, mentioning the fact that *Opalina* fragments into dissimilar pieces which later by regeneration reach normal form.

Bütschli (1886) describes and figures the alveolar structure of the endoplasma of *O. ranarum* and says that the ectoplasma shows similar structure.

Pfitzner (1886) gives a [too schematic] account of the division of the nnclei in *O. ranarum*. He interprets the refractive spherules as algae. He showed clearly that the nnclei of *O. ranarum* divide mitotically. The true nucleolus was not seen. The absence of centrosomes and the persistence of the nuclear membrane were observed. Splitting of the chromosomes was [mistakenly] said to occnr during a typical eqnatorial plate stage.

Nussbaum (1886) gives a brief outline of the life history of *O. ranarum* after Engelmann and Zeller. He says the least particle of foecal matter canses a culture of *Opalina* quickly to die. [Others, myself included, have found that cellures with foecal matter live longer than those without.] He describes form, mode of swimming, and structure. He says that division apparently stops during the winter sleep of the host: that animals ready for encystment have four or more nuclei. [I find frequently one, two, or three, as well ar four or more]: division is described at considerable length; the products of division are not always alike; sometimes there is division into three pieces; at the temperature of the room division occupies forty to forty-five minutes; division of the body is independent of the division of the nuclei, but division of the nucleus does not occur dnring division of the body. [I have not found the last statement correct for my preparations]; the direction of the mitotic spindle with reference to the planes of the body is very various; the nuclei show no interrelation in their divisions, dividing at different times without reference to one another: he found multinucleated and uninncleated cepts in the recta of tadpoles and thought it probable that the latter are derived from the former by fusion of nuclei: the nuclei of the young *Opalinae* in the tadpoles divide mitotically: he confirms Zeller that some *Opalinae* in the

frog's rectnm remain large in the spring and do not rapidly divide: the cysts in the tadpole hatch in either the intestine or the rectum, some within an hour after ingestion, some remainiug unhatched as much as seven days: the cysts never hatch in water bnt will hatch in the aqueous humor of the frog: experiments in artificial division were unsuccessful for the pieces, like the whole animals, died.

Balbiani (1887) refers at some length to the Opalinas; naming the hosts of the five species then known [*Bombinator* should have been included as a host of *O. intestinalis* (*cf* Zeller 1877)]; diagnosing the genus and describing the shape of all the species except *O. intestinalis*; brief citations are made of the work of Zeller, Engelmann, and Nussbaum, upon the rapid division in the spring and encystment; he mentions having, frequently himself seen, in *O. ranarum*, conjugation preceeding the rapid multiplication in the spring [donbtless it was obliqne division already correctly described by Zeller].

Entz (1888) [whose paper I have been unable to obtain] is qnoted as saying that *Opalina* npon a partly shaded slide will swim out of the lighted area into the shaded area [a result not confirmed by other students].

Bütschli (1887—1889) in his great work upon the *Protozoa* in Bronn's *Klassen und Ordnungen des Thierreichs*, gives [not quite complete] literature references to that date. He describes the genus, giving fignres of *O. ranarum*, *O. dimidiata* and *O. intestinalis*. He [mistakenly] snggests that the oblique division described by Zeller was propably conjugation. The figures of mitosis, apparently taken from Pfitzner, are inaccnrate. He [mistakenly] says (p. 1500) that the nnclei lie close under the cnticle, irregulary distributed in a single layer. He says the nuclei are comparable to micronuclei, not macronuclei [They are probably comparable to both, each nucleus being both nutritive and generative].

Fabre-Domergue (1888) mentions with approval Bütschli's (1886) "first" [1]) description of alveolar protoplasm in *Ciliata*, observed in the ectosarc [Bütschli says endosarc] of *O. ranarum*.

Verworn (1889) found that *Opalina* [probably *O. ranarum*] gave no reaction to stimulation by light. The center of a drop of water was brilliantly illuminated while the rest remained dark. There was no difference in the behaviour of the Opalinas in the two areas

[1]) Leydig (1857) had already mentioned the "beautifully cellular structure" of the ectosarc of *Opalina*.

and they were equally abundant in the two regions. Light causes no injury to *Opalina*. A frog was opened in faint light and the Opalinas in the rectnm were placed in two cultures, one remaining in the dark, the other being placed in bright daylight. No subsequent difference between the two cultnres was observed. He found that Opalinas in a cultnre swim indifferently toward the warmer or toward the cooler area.

In a second paper (1890) VERWORN showed that *O. ranarum*, stimulated by an electric current, swims toward the anode.

PARKER (1891 and subsequent editions) describes briefly the strncture and life history [so far as then known] of *O. ranarium*. [The only error is the statement (after ENGELMANN) that] the little *Opalinae*, which hatch from the infection cysts in the alimentary canal of the tadpole are uninncleated.

PERRIER (1893) refers to the difference between ectosarc and endosarc in *O. ranarum*, to the presence of paraplasmatic bodies [refractive sphernles] in the cytoplasm, to the process of encystment, to the fact that nnclei and cytoplasm divide independently, to the process of mitosis which is described according to PFITZNER's observations [and therefore inaccnrately].

VERWORN (1896) mentions again the anodic galvanotropism of *O. ranarum* and says further that nnder stimulation from a strong current the side of the body toward the kathode becomes clearer and more strongly refractive; that the grannles of protoplasm and the nnclei withdraw more and more from that edge of the body; that small hyaline vesicles soon appear there; that the cilia of that side are then destroyed; and that the contour of that part of the body then becomes nneven. There follows immediately a granular disintegration of the side of the body toward the kathode. VERWORN believes that the anodic galvanotropism of *O. ranarum* is due to a contractile irritation of the kathodic side of the body [later shown by DALE (1901) and WALLENGREN (1903) to be a mistaken interpretation].

DELAGE & HEROUARD (1896) [mistakenly] interpret ZELLER's fignre of the form [which NERESHEIMER has named] *O. zelleri*, as indicating the presence of remnants of an excretory organ.

LOEB & BUDGETT (1897) quote VERWORN's description of the fragmentation of the kathodic side of the body of *O. ranarum* under strong electric stimulation, ascribing this to the action of acid; they believe that this anodic reaction of *Opalina* is due to the fact that it is always studied in physiological sodium chloride solution. [PÜTTER, 1900, has shown the error of this assumption.]

Parker & Haswell (1897) say "in *Opalina* numerous nuclear bodies are present which divide by mitosis, and therefore resemble micronuclei: if they are to be considered as such, this genus must be held to differ from the other *Ciliata* in the total absence of a meganucleus". They refer to the processes of reproduction in the spring as described by Zeller and give figures from Zelller, Kent and Pfitzner (mitosis).

Von Prowazek (1898) says that the protoplasm of *O. ranarum* stains *intra vitam* rosy red with neutral red, the unstained nuclei then being more evident. [I have not found a diffuse protoplasmic stain with very weak solutions of this reagent.]

Tönniges (1898) recognised the alveolar structure of the protoplasm of *O. ranarum* and distinguished the ectosarc and endosarc. He describes the cilia as perforating the pellicle [*vs.* Bütschli 1887—1889 p. 1325. The cilia propably consist of a prolongation of the pellicula containing an axial fibril which extends at its base through the pellicula, to the basal granule. Both Bütschli's and Tönniges' statements seem to be correct but incomplete.] and as arising from the nodal points of a network of very delicate fibrils lying beneath the cuticle, ascribing the motion of the cilia to the contraction of these fibrils. He describes well the alveolar structure of the refractive spherules of the endoplasma. He says that they divide by constriction [probably an error]; that they are not excretory and are probably not parasitic, but are to be interpreted as a diffuse macronucleus.

In a further communication the following year (1899), in regard to *O. ranarum*, he notes that the division of the body has no discernable relation to the division of the nuclei; he describes irregular divisions of the body; he says that the several nuclei within the multinucleated cysts fuse into one [not confirmed by later students]. The nuclear membrane is described as showing alveolar structure [not confirmed by my study]. Amitotic division is said to occur side by side with mitotic division in the fullgrown forms [not confirmed by later students]. The true nucleolus was not observed. Pfitzner's work was confirmed in that no centrosomes were found and the nuclear membrane was seen to persist during the mitosis. The chromatin is described as superficial, lying just beneath the nuclear membrane. No longitudinal splitting of the chromosomes was seen.

Birukoff (1899) discusses Verworn's observations upon positive galvanotropism in *O. ranarum*.

Boveri (1900) discusses the evolution of centrosomes and mitotic spindle, illustrating from the nucleus of *O. caudata* one stage in this hypothetical evolution. He notes (p. 185) that the division of the nuclei and the division of the cytoplasm are relatively independent phenomena in the multinucleated *Opalinae*, and (p. 187) that, in the binucleated *Opalinae*, the binucleated condition is apparent, not real, being due to delay in division of the body after the division of the nuclei.

Pütter (1900) opposes Loeb & Budgett's (1897) statement that the anodic reaction of *Opalina*, differing from all other *Ciliata*, is due to its always being experimented upon in sodium chloride solution. He found that when *Opalina* and *Balantidium* from the same host were experimented upon together in the same culture, *Opalina* showed anodic reaction while the reaction of *Balantidium* was kathodic.

Lang (1901) classes *Opalina* in the suborder *Hymenostomidae* among the *Ciliata holotricha*. In the same suborder, which he characterizes as having the mouth always open and as possessing an undulating membrane, he places *Colpoda*, *Colpidium*, *Urocentrum*, *Paramaecium*. *Anoplophrya*, *Frontonia*, *Leucophrys*, *Ophryoglena*, and *Pleuronema*. [*Opalina* of course has no undulating membrane and no mouth.]

Doflein (1901) gives a succinct account of the structure and development of *Opalina*, [as liable to mislead, may be noted the statements that] the ectoplasma is homogeneous and that the endoplasma is granulated; and, [as a probable error] quoted from Przesmycki, the statement that the animals in the cysts often divide into several offspring.

Dale (1901) refers to Verworn's observation of positive galvanotaxis in *O. ranarum*; he notes that this species is found in the anterior end of the rectum of the frog; he describes experiments upon its chemotaxis and galvanotaxis which he summarizes as follows —

	Alkalinated	Neutralized	Acidified
Chemotaxis	Attraction to acid Repulsion from alkali	Attraction to acid Repulsion from alkali	Attraction to alkali Repulsion from acid
Galvanotaxis	Collects at anode	Collects at anode	Collects at kathode;

he describes the normal movements of the cilia and their reaction to chemical and electrical stimuli; he describes the modification of galvanotaxis by changes in concentration of the media; and finally considers theoretically the phenomena.

Conte & Vaney (1902) mention the occurrence of *O. intestinalis* in *Triton taeniatus*, the first report of *Opalina* from a tailed Batrachian. They say the refractive spherules arise in the nucleus and wander out through the nuclear membrane into the cytoplasm. There are regarded as comparable to zymogen granules and yolk nuclei.

Kunstler & Gineste (1902) give some anatomical notes upon *O. dimidiata* emphasizing especially the presence in the endoplasma of certain "vesicles" which contain each a central granule, which reproduce by division and which therefore have an individuality of their own. [Instead of one granule, these bodies, the endosarc spherules, contain many. They apparently do not divide. Instead of being constituent parts of the living protoplasm they seem to be nutritive material, paraglycogen, so that Kunstler & Gineste's conclusions in regard to them seem inadmissible.]

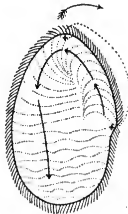
Kölsch (1902) studies minutely the drops of liqnid which are extruded from *O. ranarum* and *O. dimidiata* when under pressure. He believes that the pressure causes partial liquefaction of the pellicle, that the culture flind (sodium chloride solution) is thus allowed to enter the body, and that this fluid unites chemically with the protoplasm forming "paramylin". He confirms Verworn's description of anodic galvanotropism in *O. ranarum* and describes the peculiar but constant curve through which it swims slowly toward the anode.

Hickson (1903) makes numerous [inaccurate] references to *Opalina*. He says (p. 364) "The mouthless *Opalina* found in the bladder [!] of frogs may owe its many peculiarities of form to its entozoic habits"; *Opalina* is included with other *Ciliata* in the [mistaken because incomplete] statement (p. 368), quoted from Bütschli, that the cilia spring from the pellicula and are continuous with it; reference is made to the nuclei of *Opalina* as follows (p. 378): "If the current views concerning the nuclei of *Opalina* are trustworthy, this genus should no longer be regarded as a member of the *Heterocaryota* [*Ciliata*]. *Opalina* possesses, according to Pfitzner and others, a large number of meganuclei, but no micronuclei. [Pfitzner (p. 466) regards the nuclei of *Opalina* as homologous with the micronuclei of *Paramaecium*.] Thin sections of *Opalina* that are suitably stained show, in addition to the numerous macronuclei, a large number of small bodies containing chromatin. They are probably micronuclei. [The accompanying figure shows them to be refractive spherules of the endosarc.] The meganuclei divide sometimes amitotically [probably not true], and it is probable that they always do so [mistaken]. The mitotic figures discovered by Pfitzner are clearly seen in a

large number of sections examined, but they are smaller than the meganuclei [no] which, as in other forms, increase considerably [very slightly] in size before division." [Each nucleus of *Opalina* seems to be functionally comparable to both micro- and macronucleus of higher *Ciliata*, but to be homologous with each, both the nuclei of *Ciliata* being phylogenetically complete nuclei.]

Wallengren (1903) describes the form of the body of *O. ranarum* (Text Fig. XVI) [which has its very broad anterior end bent "to the right"]; the arrangement of its cilia; the normal movement of the cilia in which the cilia that lie along the "anterior half of the right side" [corresponding to the morphological anterior end] beat forward [morphologically backward and toward the left] while all the others beat backward, the animal thus turning over to the right as it swims; he describes and analyzes the reactions of the cilia under electric stimulation, which cause the animal with a weak current to swim forward toward the anode, with a stronger current to swim forward toward the kathode, with a still stronger current to swim backward or sidways toward the anode.

Maier (1903) describes carefully for *O. ranarum* the pellicula. and the cilia and their basal granules. He denies the connection of the cilia with a network of subcuticular fibrils such as Tönniges describes, ascribing the appearance of the transverse lines observed to ridges in the pellicle. [My study confirms Tönniges as to the presence of a sub-pellicular network in connection with the cilia, though I would not ascribe the movement of the cilia to the contraction of the fibrils of the network. The network seems more likely to be useful for the coordination of the movements of the cilia.] Maier opposes Tönniges' description of the alveolar struc-



Text Fig. XVI.

Wallengren's figure of *O. ranarum*, illustrating the direction of the motion of the cilia waves (plain arrows) and the direction in which the animal turns (feathered arrow). The dotted lines across the body do not indicate the lines of insertion of the cilia but the waves of contraction of the cilia. What I interpret as the morphological anterior end stretches form + to + and is indicated by the dotted index line.

ture of the refractive spherules, saying they are homogeneous. [Bezzenberger and I confirm Tönniges.] Maier opposes Tönniges' description of the ectoplasma as containing large alveoles, saying that its alveoles are as small as those of the endoplasma. [My work confirms Tönniges.]

Veneziani (1904) divided cultures of *O. ranarum* into two exactly eqnal parts and placed a tube containing $^1/_{10}$ gram of active radium bromide in one dish and none in the other. In ten experiments when the culture medium was 0.5 % or 0.6 % sodium chloride solution, and in four experiments when the animals very kept in ordinary water (not distilled), the Opalinas in the culture containing the tube of radinm bromide remained active longer than in the corresponding unstimulated cultures. The author says it is doubtful whether the longer continued activity of the Opalinas is due to the direct effect of the radinm upon their protoplasm, or to same modification of the density or chemical composition of the cnlture media.

Statkewitsch (1904) finds that *O. ranarum* does not react at all to weak constant and induction electric currents (0.5—1 MA), with stronger currents (3 - 4 MA) they generally swim slowly toward the kathode. With rather strong currents (2.3 or 4 MA) they often swim slowly toward the anode; sometimes they first approach the anode and later turn and approach the kathode. Often with a weak current they start toward the kathode, but, without reaching it, turn back and swim in various directions throngh the culture. In the latter cases they probably become accnstomed to the stimulation. The character of the reaction depends on the strength of the current.

In another paper (1905) Statkewitsch mentions *O. ranarum* in a discussion of the reactions of cilia in the *Ciliata* to electric currents.

Bezzenberger (1904) describes five new species of *Opalina* from Asiatic frogs and toads (*O. macronucleata*, *O. lanceolata*, *O. coracoidea*, *O. lata* and *O. longa*), giving many anatomical details. He figures mitosis in *O. macronucleata* and *O. lanceolata* (*cf.* Text Fig. V, page 250). For *O. longa* he describes very peculiar elongated rod-shaped basal granules of the cilia, reaching from the pellicula through the whole ectoplasma and as far again into the endoplasma. The ectoplasma is described as having a zone entirely without demonstrable structure. [His fignre was evidently drawn from very poorly preserved material in which it was probably not possible to recognise the real structure of pellicnla, cilia, basal granules, or ectoplasma.] The proto-

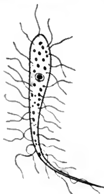
plasm of *Opalina* is spoken of as containing intestinal contents. [It is, I think, always free from food particles or foecal matter, as Stein had already shown.] He confirms Tönniges' statement that the refractive spherules contain granules, but finds no sign of alveolar structure in them. [My work confirms Tönniges in the latter regard.] He saw no indications of division of the refractive spherules. The longitudinal striae, between the rows of cilia, he describes as compesed of rows of granules. [My study indicates that this always hazy appearance of granules (Fig. 2, Pl. XIV) may be an optical effect produced where the longitudinal ridges (Maier) of the pellicula pass above the transverse fibrillae (Tönniges) of the subpellicular network which is connected with the basal granules of the cilia.]

Löwenthal (1904) describes for *O. ranarum* the formation of the chromatin spheres in the nuclei before encystment (Text Fig. X, page 280). He distinguishes the more strongly staining sphere from the less deeply staining [and, according to my own observations, granular] mass, saying that the former arises from the latter. The deeply staining compact sphere he regards as homologous to a micronucleus (sexual), the weakly staining residue to a macronucleus (nutritive). His figures show what he believes to be the sequence of phenomena. [The darkly staining spheres are extruded from the nucleus, as Neresheimer and I have shown, and go to pieces in the cytoplasm. They are probably composed of nutritive chromatin.]

Cohn (1904) gives an account of *O. intestinalis*, which is either inaccurate in most points, or is based wholly or in part on abnormal animals or on some other form or forms. Some of the features described [which do not fit normal *O. intestinalis*] are: that the body is often triangular and flattened; that the refractive spherules disappear after twenty-four hours if the animals be kept without food in a hanging drop in a moist chamber; that the alveoles of the cytoplasmic foam grow smaller from the center of the body toward the periphery; that small forms are never binucleated and large forms never uninucleated. The individuals figured in conjugation are evidently not Opalinas. The budding described appears, to have been pseudoencystment following fragmentation.

Léger & Duboscq (1904*a* and *b*) give a fine account of the structure of an interesting new species, *O. saturnalis*, which is found in the rectum of *Box boops*, a fish from the Mediterranean Sea. This is the only *Opalina* which is reported from a host which is not an Amphibian. The authors describe elongated and stocky forms [as in *O. caudata*]; "lecithin (?)" bodies [my "ectosarc spherules"] are

described in the outer, coarsely alveolated layer of the body; the endosarc is said to show no special inclusions [but bodies apparently resembling the ordinary refractive spherules of the endosarc are figured]; the phenomena of mitosis are described with very clear figures (*cf.* Text Fig. IV, page 249); longitudinal division is described and figured; uninucleated infection cysts are shown; true copulation was not observed; an individual resembling a microgamete or microgamete mother-cell is described and figured (Text Fig. XVII) without being recognised as a gamete; *O. saturnalis*, on the ground of its occurrence in a marine fish, is regarded as the most primitive of the *Opalinae*. The authors say the family *Opalininae* (including the genus *Opalina*, *Opalinopsis* and *Foettingeria*) should be sharply distinguished from the *Anoplophryinae* (including *Anoplophrya* and *Hoplitophrya*, which they would unite to form one genus *Herpetophrya*) and that the two families should not be regarded as closely related, the resemblance between them being a superficial one due to convergence caused by parasitism. The authors describe for *O. ranarum* three sorts of cysts 1) the well known infection cysts, "exogenous", 2) "endogenous" cysts — in an ordinay large individual a bit of the protoplasm containing one to four nuclei separates itself from the rest of the protoplasm and forms a cyst around itself, being then extruded from the body —, 3) conjugation cysts — two individuals like those of the ordinary cysts come together by their anterior ends, lie for a long time rubbing against each other and turning, and then form a cyst enclosing them both, each animal occupying half of the cyst. [These remarkable phenomena of the formation of the second and third kinds of cysts have not been observed by other students. Léger & Duboscq's very brief unillustrated description can hardly be accepted without confirmation.]


Text Fig. XVII.
An individual of *O. saturnalis* figured by Léger & Duboscq. Doubtless it was a microgamete or a microgamete mother-cell.
× 600 diameters.

Fauré-Fremiet (1904), in a brief discussion of the structure of protoplasm, refers to Kunstler's [Kunstler & Gineste's] idea of the vesicular structure of protoplasm. He says that the "vesicles" of Kunstler [in part refractive spherules of the endosarc in *O. dimidiata* and other *Protozoa*] are not inclusions, are not reserve food, are not

excretory vesicles. [Several different unrelated structures seem to be included under the term "vesicles" as here used. The endosarc spherules of *Opalina* seem to be composed, chiefly at least, of paraglobulin and to be a reserve food supply. The often reiterated conceptions of KUNSTLER & GINESTE and FAURÉ-FREMIET seem therefore to be founded on an insecure foundation.]

KUNSTLER & GINESTE (1905) discuss the refractive spherules of the endoplasma in *O. dimidiata*; they say that they divide by constriction, a central granule in each dividing first [not confirmed by NERESHEIMER or myself]. They estimate eight thousand of these spherules to be present in an *O. dimidiata* $112^1/_2$ μ long by $37^1/_2$ μ broad. These spherules are regarded as a secretory apparatus. [They are apparently paraglycogen.]

SCHOUTEDEN (1905) in a brief note reports finding longitudinal division (ZELLER's oblique division) in *O. ranarum* very frequent in the spring. Division took from 50 to 90 minutes. In isolated individuals he saw the longitudinal division begin and complete itself, thus confirming ZELLER's description of the division (as COHN had done before) and refuting BÜTSCHLI's suggestion that ZELLER had probably mistaken conjugation for division.

PÜTTER (1905) finds that after an hour in sodium chloride solution *O. ranarum* begins to show signs of injury, cilia movements becoming slower. The animals are at first clear and transparent, as they become abnormal they get darker. The abnormal condition and final death may be caused by the unnatural environment, or may be due to the noxious effect of free oxygen in the cultures. *Opalinae* in culture media containing no free oxygen live longer than those in control cultures in which free oxygen is present. A better culture medium than sodium chloride solution is a solution made of

sodium chloride 0.8 %	100 parts
sodium and potassium tartrate 30 %	5 „
distilled water	400 „

In this fluid, free from oxygen, *Opalinae*, if fed, live up to three weeks. Without food they live from one to seven days, showing how long they can live upon the energy already stored in their bodies, for there is in the fluid no source of energy for the *Opalinae*. The stored energy in the bodies of the *Opalinae* is not in the form of "*Polysachariden*", for with iodnie we do not get the characteristic color reaction. [This statement needs modification. Compare BARFURTH (1885) and my statement of the reaction to iodine—page 216.] The stored energy is not in the form of fat, so probably it must be

some form of proteid. The appearance of myelin after solution (Kölsch) would favor the presence of Lecithin. [Nutrition in a form similar to glycogen seems to be present.] The *Opalinae* live longer in this oxygen-free cultnre fluid if certain substances be added. Addition of egg albumin, maltose (?), and uric acid especially a mixture of uric acid and dextrin, produce this result. It is not certain whether in the case of egg albumin the *Opalinae* form an extracellular enzyme which digests it, or whether the egg albumin is acted npon by anaërobic bacteria and is changed to a liquid dialyzable form. In the case of uric acid it is doubtful if the effect is an indirect one, or if the acid is used as food. Pütter says that after a few days in the cultures rather numerous instances of conjugation [doubtless really longitudinal division] and of transverse division appear.

Fauré-Fremiet (1905 *a* and *b*, 1906 *a* and *b* discusses the refractive spherules in the *Protozoa*, referring with approval to Kunstler's [Kunstler & Gineste's] interpretation of these bodies in *Opalina* as a secretory apparatus. He distinguishes [upon grounds that are not clear] between "spheroplasts of internal secretion" and "spheroplasts of external secretion". The spherules of *Opalina* are said to belong to the latter group. They are regarded as fundamental elements of the cell, comparable to the "leucites" of plants and to the nucleus in this regard.

Hartog (1906) notes Opalina's positive galvanotaxis and refers to Dale's experiments which show that the direction of motion varies with the nature and concentration of the medium; "It would thus be a reaction to the ion liberated in contact with the one or the other extremity of the being". *Opalina* is classed among the *Flagellata* in the group *Protomastigaceae*. The author says "The numerous similar long flagella of the *Trichonymphidae* afford a transition in the genus *Pyrsonympha* to the short abundant cilia of *Opalina*, usually referred to the Ciliate Infusoria"; and again "The *Opalinidae* have also an investment of cilia, which are short and give the aspect of a Ciliate to the animal. But despite the outward resemblance, the nuclei, of which there may be as many as 200, are all similar, and consequently this group cannot be placed among the Infusoria at all".

Kunstler & Gineste (1906 *a* and *c*) describe for *O. dimidiata*, a mouth and spiral oesophagus, a cup-shaped depression, in front of the mouth, into which opens an excretory tube whose branches ramify through the body, and retractile papillae at the posterior end

of the body in the midst of which is an anal aperture leading from a short rectal tnbe. The position of the mouth indicates the trne ventral surface, the animals having bilateral symmetry. [In careful study of living animals, and of preparations of total objects and sections, of *O. dimidiata* and other species, I have found no trace of any of the organs mentioned, and cannot believe them to be present.]

Kunstler & Gineste (1906 *b*) describe the protoplasm of abnormal *O.* [*dimidiata?*] (kept too long in pure water, or from frog kept too long in captivity [?]) as resembling a continuous gelatinous snbstance, the appearance of a net, seen in the protoplasm of normal animals, being no longer discernable.

Schneider (1906), after studying iron-haematoxylin sections of *O. ranarum*, quotes with approval (p. 48) Maier's statement that the ectosarc is homogeneous [apparently referring to only what I have called the subcnticular layer, since he later mentions the presence of large spaces filled with a thick snbstance, which were doubtless the large alveoles of the ectosarc]. He describes (p. 49, Fig. 14 a—c) the appearance of threads, coarser and finer, which one sees in iron-haematoxylin preparations, distinguishing coarser branching fibres, connected with the basal grannles of the cilia, from more delicate ones forming a network not connected with the cilia. At the nodal points of this delicate network one sees thickenings. The coarser threads lie chiefly in the ectosarc, but extend also into the endosarc, the finer threads lie throughout both ectosarc and endosarc. Lying upon the latter [error] are found the disc-shaped granules [refractive spherules] described by Zeller. Schneider strongly opposes Bütschli's conception of the cytoplasm of the *Infusoria* as alveolar, saying that the threads described form clearly a framework within the cytoplasm, such as is present in the ciliated cells of *Metazoa*. [Had Schneider stndied sections of *Opalina*, especially *O. intestinalis* or *O. caudata*, which had been stained with Ehrlich's triacid mixture and others stained with methyl violet, he conld hardly donbt the alveolar nature of both ectosarc and endosarc. The threads he describes seem to me chiefly optical sections of the walls of the alveoles.] Schneider describes (p. 50) and figures (his Fig. 14 *c* and *d*) the appearance [described by Tönniges, Maier and Bezzenberger. *Cf.* my Plate I, Fig. 2] of longitudinal markings between the rows of cilia, and other similar transverse markings at a more internal level. He says the latter have no connection with the cilia. [Tönniges, and, in the present paper, I also, describe the transverse fibrils as uniting the bases of the cilia.] Schneider

describes (p. 62) the drops of liqnid which exude from the ectosarc of *Opalina* when pressed; the fact that they do not mix with the water; and the further fact that on relieving the animal from pressure the drops are again absorbed by the body. These he regards as drops of hyaloplasma. Schneider says (p. 71) that the protoplasmic currents, so general in the *Infusoria*, are entirely wanting in *Opalina*. His discnssion of the hyalo plasma (p. 83—111) is based in part upon his studies of *Opalina*. He strongly opposes Bütschli's belief in the prevalence of alveolar structnre in living protoplasm. [It seems to me that few objects could be found more satisfactory than *O. intestinalis* and *O. caudata* for demonstrating the alveolar structure of protoplasm.]

Jennings (1906) describes the "avoiding reaction" in *O. ranarum*, and its behaviour with reference to acid and alkaline media showing that Opalina's reactions to stimuli, like those of other Protozoa, are always negative or null, never positive; he also quotes, with figures, Wallengren's analysis of the reaction of the cilia of this species to electric stimuli of different intensities.

Neresheimer (1906 preliminary notice, and 1907) is the first to recognise the presence of gametes in *Opalina* and is the first to describe the extrusion from the nuclei of the chromatin spheres previously described as micronuclei by Loewenthal. He saw no splitting of the chromosomes, confirming Tönniges and Bezzenberger against Pfitzner. He found the chromosomes in the asexual forms of *O. ranarum* and *O. dimidiata* to be apparently 12 in number. He describes in detail phenomena preceeding encystment in the rectum of the frog; the process of encystment and the character of the infection cysts; the hatching of the cysts in the rectum of the tadpole; the formation of isogametes and their copulation; encystment following copulation; a spindle-like shape of the male and female pronuclei in the copulation cysts, and of the large syncaria of the zygotes. He gives the name *O. zelleri* to the large stocky form which Zeller found with *O. dimidiata* in *Rana esculenta*, having himself seen the same form in the same host. On the basis of its manner of reproduction, he regards *Opalina* as related to the *Plasmodroma* rather than to the *Ciliophora*. [In many points the results of my stndy are opposed to Neresheimer. Some of his statements and beliefs to which I am unable to snbscribe are: — his detailed description of the formation of generative chromidia, the degeneration of the old nuclei, and the formation of new sexual nuclei from the generative chromidia and refractive spherules, all of which is

said to preceede the formation of the infection cysts in the rectum of the frog; the complete disappearance of the refractive spherules before the formation of the infection cysts; the presence of always two and only two chromatin spheres in the nuclei before the formation of the infection cysts, and their extrusion, one before encystment, and one afterwards in the water or in the rectum of the tadpole (The definitiness of these phenomena seems to me uncertain); the presence of a double number of chromosomes in the sexual nuclei, 24 instead of 12 for *O. ranarum* and *O. dimidiata*; isogamous copulation; encystment following copulation (This seems to me doubtful); his interpretation of certain phenomena as abnormal budding (probably heterogamous copulation); his statement that the refractive spherules are homogenous; his belief that *Opalina* is related to the *Plasmadroma* rather than the *Ciliophora*; and his belief that all healthy frogs contain Opalinas.]

Dobell (1907) observed *O. ranarum* and says he "confirms fully" Neresheimer's description of the nuclear phenomena preceeding encystment, i. e., "(1) formation of chromidia, (2) synthesis of fresh, nuclei from these chromidia, (3) reduction of chromatin and (4) encystment" [(1) and (2) I have not succeeded in finding in *O. ranarum*, or in any multinucleated *Opalina*; they do not occur in *O. intestinalis* or *O. caudata*; (3) seems to have no connection with true "reduction"]. He observed and interprets as degenerative 1) the irregular divisions preceeding encystment [described by Tönniges for *O. ranarum*; see my Text Fig. III, page 241]; 2) the loss of cilia from animals kept "some days" outside the host; 3) the presence of refractive spherules in the cytoplasm, which "ultimately run together forming large masses lying in the cells" [the refractive spherules are, of course, present in normal Opalinas; I have never seen them fused to form large masses]; 4) nuclear degeneration accompanied by amitotic division, equal or unequal: the degenerating nuclei are said to extrude their chromatin in the form of chromidia and entirely disappear; "as a rule most of this chromatin is cast out of the organism, which then dies and breaks up, but occassionally only a part of the chromatin in cast out and perishes, the remaining granules" running together to form "two nuclei, consisting of solid chromatin", which "then approach one another and fuse".

Metcalf (1907 *a*) a preliminary notice of the present paper.

Hartmann (1907) accepts Neresheimer's (1907) conclusion that *Opalina* should be removed from the *Ciliophora* to the *Plasmodroma*, but does not assign it a definite position in the latter group.

Metcalf (1907 *b* and *c*) describes large excretory organs in *O. intestinalis*, *O. caudata* and *O. dimidiata*, and a very rudimentary excretory organ in *O. obtrigona*. No excretory organs were found in *O. ranarum* or *O. zelleri*, that which Delage & Herouard interpreted as remnants of excretory canals in the latter species not being so. The excretory organ is very simple, being merely a series of enlarged and connected alveoles of the ordinary cytoplasmic foam. The primitive character of the excretory organs and their resemblance to those of *Hoplitophrya* is emphasized.

Loewenthal (1908)[1]) found cysts of *O. ranarum* in young partly grown *Ranae temporariae* [showing that sexual maturity of the frog and the approach of its breeding season is not a necessary stimulus and probably does not furnish any stimulus to cause encystment of the parasites.] Cysts are sometimes found containing two Opalinas. This condition does not surely indicate division within the cyst, but in one observed instance arose by a fusion of at first independent cysts. This is regarded as very likely pathologic. Neresheimer's (1907 and 1908) description of the extrusion of chromatin spheres from the nuclei of encysted Opalinas is confirmed. Loewenthal gives up his former (1904) interpretation of these bodies as micronuclei and accepts Neresheimer's comparison of the phenomena with the formation of polar bodies [This I have opposed]. Stained with Giemsa's solution the spheres[1]) are clear blue [a reaction usually thought to indicate achromatic nature] while the smaller granules are red. If the nuclei are stained with methyl green in weak acetic acid, only the spheres are green [a reaction generally accepted as almost definitive for chromatin]. Treated with acetic acid the spheres become more highly refractive, if ammonia be added they become invisible but are not dissolved, both reactions indicating that the spheres are chromatin [?; the nucleoli show similar reactions]. On the basis of the reaction to Giemsa's stain the substance of the spheres is called cyanochromatin and the finer granules in the nucleus erythrochromatin, the two sorts of chromatin being regarded as functionally different, corresponding the cyanochromatin to Schaudinn's somatic chromatin, the erythrochromatin to his sexual

[1]) Through the kindness of Dr. Hartmann I have been able to read the manuscript of this interesting paper, sent to him for publication, and to include a reference to it here.

[1]) Loewenthal cells them "*Körperchen*".

chromatin. In "*Paramaecia*" [probably *Balantidium*] from the rectum of the frog, and in other *Ciliata*, Giemsa's staining colors the micronucleus red, the macronucleus blue. [The finer nuclear granules in *Opalina* I have regarded as chiefly achromatic, being influenced largely be their behaviour in degenerating nuclei of *O. obtrigona*, and by the fact that after staining with safranin and light green they are green, not red.]

Appendix. ***Staining reactio***

	Stains and Reagents	Cilia	Pellicula	Basal granules of Cilia	Ectosarc films and granules	Ectosarc spherules
	Intra vitam.					
1	Neutral red	O	O	O	O	dark red
2	Methylen blue	O	O	O	O	blue
3	Toluidin blue	O	O	O	O	blue
4	Congo red	O	O	O	O	0
5	Indigo-carmine	O	O	O	O	0
6	Methyl violet	O	O	O	O	0
7	Dahlia	O	O	O	O	0
8	Bismarck brown	O	O	O	O	0
9	Gentian violet	O	O	O	O	0
10	Thionin	O	O	O	O	0
	After fixation with corosive-sublimate-acetic acid.					
11	Methylen blue	O	faint blue	green	green	green
12	Methyl violet	violet	very pale violet	violet	violet	pale violet
13	Gentian violet	pale violet	pale violet	dark violet	violet	violet, the smaller are darker
14	Thionin	O	O	green	green	green
15	Dahlia	very faint purple	very faint purplish gray.	purple	purple	purple
16	Fuchsin	pale red	good red	pale red	films faint pink, granules yellow with faint pink flush.	yellow with faint pink flush
17	Rubin S.	pale red	red	red	red	pale red
18	Orange G.	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow
19	Bismarck brown	brown	brown	brown	brown	brown
20	Kernschwarz	brown	brown	brown	brown	brown
21	Safranin	red	red	red	red	red
22	Safranin and light green	green	green	green	green	green
23	Ehrlich's triacid mixture	? very faint	green	blue	blue	O
24	Biondi-Ehrlich-Heidenhain's mixture	? very faint	green	blue	blue	O
25	Borax carmine	faint red	? very faint	red	red	O
26	Paracarmine	faint red	? very faint	red	red	O
27	Delafield's haematoxylin	blue	blue gray	blue	blue	muddy yellow, i. e. unstained
28	Heidenhain's iron-haematoxylin	O	O	black	black	larger, gray smaller, black
29	Ehrlich's indulin-aurantia-eosin	blue	blue		very faint blue, almost unstained	O

n Opalina. (O = unstained.)

Endosarc films and granules	Endosarc spherules	Endosarc, Granules in posterior end of Excretory organ	Nuclear Membrane	Nucleus, Achromatic films and granules	Nucleolus	Nucleus, Chromatin including fibres	
O	dark red	O	O	O	O	O	1
O	O	O	O	O	O	O	2
O	O	O	O	O	O	O	3
O	O	O	O	O	O	O	4
O	O	O	O	O	O	O	5
O	stain strongly	O	O	O	O	O	6
O	stain well	O	O	O	O	O	7
O	O	O	O	O	O	O	8
O	violet	O	O	O	O	O	9
O	O	O	O	O	O	O	10
blue	O		?	very faint blue	very faint blue, almost unstained.	faint blue	11
violet	O		dark violet	violet	very faint blue, almost unstained.	red violet	12
violet	O		violet	violet	O	violet	13
blue	O		dark blue	faint blue, almost unstained.	O	blue	14
purple	O		purple	faint purple	O	purple	15
faint pink	good red		red	films pink, granules red	red	pink	16
pale red	good red	good red	red	red	red	red	17
yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	yellow	18
brown	brown	brown	brown	brown	brown	brown	19
brown	brown	brown	brown	dark brown	brown	dark brown	20
red	fainter red	red	red	red		red	21
green	very pale red		green	green	green	red	22
blue	red purple		blue	blue		purple	23
blue	red	blue	blue	blue	blue	blue	24
red	O	dark red	red	red	O	red	25
red	O	red	red	red	O	red	26
blue	O	dirty dark dull blue	dark blue	dark blue	light grayish blue	very dark blue	27
black	black	black	black	black	black	black	28
blue	red		blue	blue		red	29

Literature Index.

Balbiani (1881): Les organismes nnicellnlaires. Les protozoaires. in: Journ. de Micrographie T. 5 p. 357.
— (1887): Evolution des microorganismes animals et vegetatives parasites. in: Jonrn. de Micrographie T. XI p. 293.
Barfurth (1885): Vergleichend-histochemische Untersuchungen über das Glycogen. in: Arch. f. mikr. Anat. Bd. 25.
Van Beneden (1883): Recherches snr la maturation de l'œnf, la fécondation et la division cellulaire. Gand (Leipzig und Paris).
Van Beneden & Neyt (1887): Nouvelles recherches sur la fécondation et la division mitosique chez l'ascaride mégalocephale. Bruxelles.
Bezzenberger (1904): Über Infusorien aus asiatischen Anuren. in: Arch. f. Protistenknnde Bd. 3.
Birukoff (1899): Untersuchungen über Galvanotaxis. in: Arch. f. d. ges. Physiol Bd. 77 1899.
Bloch (1782): Abhandlnngen über die Erzeugung der Eingeweidewürmer. Berlin 1782.
Bory de St. Vincent (1824): Encyclopédie méthodique. Paris.
Bott (1907): Über die Fortpflanzung von Pelomyxa palustris. in: Arch. f. Protistenknnde Bd. 8.
Boveri (1887 a): Über Differenzierung der Zellkerne während der Befruchtung des Eies von Ascaris megalocephala. in: Anat. Anz. Bd. II.
— (1887 b): Zellen-Studien. Heft I. Die Bildung der Richtungskörper bei Ascaris megalocephala nnd Ascaris lnmbricoides. Jena.
— (1892 a): Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei Ascaris megalocephala. in: Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. in München Bd. VIII.
— (1892 b): Befruchtung. in: Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch. Bd. I.
— (1899): Die Entwicklung von Ascaris megalocephala mit besonderer Rücksicht auf die Kernverhältnisse. in: Festschr. z. 70. Gebnrtstag von C. v. Kupffer. Jena
— (1900): Zellen-Studien. Heft 4. Über die Natur der Centrosomen. Jena 1900.
— (1907): Zellen-Studien. Heft 6. Die Entwicklung dispermer Seeigel-Eier. Ein Beitrag znr Befruchtnngslehre und zur Theorie des Kernes. Jena.
Bütschli (1880—89): Bronn's Klassen u Ordnnngen d. Tierreichs. Bd. I. Protozoa. Abt. I (1880—82): Sarkodina und Sporozoa. Abt. II (1883—87): Mastigophora. Abt. III (1887—89): Infusoria und System der Radiolarien. Leipzig.
— (1885 a): Einige Bemerkungen über gewisse Organisationsverhältnisse der sog. Cilioflagellaten und der Noctiluca. in: Morph. Jahrb. Bd. X.
— (1885 b): Bemerkungen über einen dem Glycogen verwandten Körper in den Gregarinen. in: Zeitschr. f. Biol. Bd. 21.
— (1886): Kleine Beiträge zur Kenntnis einiger mariner Rhizopoden. in: Morph. Jahrb. Bd. XI.
— (1906): Beiträge zur Kenntnis des Paramylons. in: Arch. f. Protistenk. Bd. 7.
Calkins (1899): Mitosis in Noctiluca miliaris and its hearing on the nuclear relations of Protozoa and Metazoa. in: Journ. of Morphol. Vol. 15.
— (1901): The Protozoa. New York.

Calkins (1902): Marine Protozoa from Wood's Hole. in: U. S. Fish Commiss. Reports 1901.
— (1906): The Protozoan Life Cycle. in: Biol. Bull. Vol. XI No. 5.
Calkins & Cull (1907): The coujugation of Paramaecium anrelia (caudatum). in: Arch. f. Protistenk. Bd. X.
Certes (1880): Snr la glycogenèse chez les infusoires. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 90.
Claparède & Lachmann (1868): Etndes snr les Infnsoires et les Rhizopodes. Geneva et Bale (Extrait des tomes V, VI et VII des Mémoires de l'Institut Genevois 1858—60).
Cohn (1904): Zwei parasitische Infusorien aus Discoglossus pictus. in: Arch. f. Protistenk. Bd. 4.
Conte & Vaney (1902): Sur des émissions nucléaires observées chez des protozoaires. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 135.
Cull (1907): Rejuvenescence as the Result of Conjugation. in: Journ. Exper. Zool. Vol. 4.
Dale (1901): Galvanotaxis and chemotaxis of ciliate infusorians. Part. I. in: Journ. of Physiol. XXVI.
Delage & Herouard (1896): Traité de zoologie concrète. T. 1. La cellule et les protozoaires. Paris.
Dobell (1907): Physiological degeneration in Opalina. in: Quart. Journ. Microsc. Science Vol. 51.
Doflein (1900): Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. IV. Znr Morphologie und Physiologie der Kern- und Zellteilung. in: Zool. Jahrb., Abt. f. Anat. u. Ontog. Bd. XIV.
— (1901): Die Protozoen als Parasiten und Krankheitserreger. Jena.
Dujardin (1841): Histoire naturelle des zoophytes infusoires. Paris.
Ehrenberg (1831): Über die Entwicklung nnd Lebensdaner der Infusionsthiere, nebst ferneren Beiträgen zu einer Vergleichung ihrer organischen Systeme. in: Abh. d. kgl. Akad. d. Wiss. zu Berlin Jahrg. 1831.
— (1835): Zusätze zur Erkenntnis großer organischer Ausbildung in den kleinsten thierischen Organismen. in: Idem 1835.
— (1838): Die Infusionsthierchen. Leipzig.
Engelmann (1875): Over ontwikkeling en voortplanting van Infusoria: I. Ontwikkeling van Opalina ranarum binnen het darmkanal van den kikvorsch. in: Onderzoek. physiol. Laborat. Utrecht Hoogeschool. dirde Recke Bd. III.
— (1876): Über Entwicklnng und Fortpflanznng von Infusorien. I. Entwicklung nnd Fortpflanzung von Opalina ranarum innerhalb des Darmkanals von Rana esculenta. in: Morph. Jahrb. Bd. 1.
Entz (1888): Studien über Protisten. in: Auftr. d. k. Ung. Naturw. Ges. Budapest.
Fabre-Domergue (1888): Recherches anatomiques et physiologiques snr les infusoires ciliés. in: Annales des sciences naturelles Zoologie T. V.
Fauré-Fremiet (1904): Sur la structure des protoplasma chez les infusoires ciliés. in: Compt. rend. Soc. Biol. Paris.
— (1905 *a*): La structnre intime du protoplasma chez les Protozoaires. in: Compt. rend. Soc. Biol. Paris T. LIX.
— (1905 *b*): Sur la structnre du protoplasma chez les Protozoaires. Idem p. 197.
— (1906 *a*): Sur la structure intime dn protoplasma chez les Protozoaires. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 142.

Fauré-Fremiet (1906 b): A propos de la structure du protoplasma chez les Protozoaires. in: Compt. rend. Soc. Biol. Paris.

Fischer (1895): Untersuchungen über Bakterien. in: Jahrb. f. wiss. Botanik Bd. 27.

— (1905): Eine neue Glycogen-Färbung. Anat. Anz. Bd. XXVI.

Francotte, P. (1897): Recherches sur la maturation, la fécondation et la segmentation chez les polyclades. Bruxelles. Published by the Royal Acad. of Sciences of Belgium.

Göze (1782): Versuch einer Naturgeschichte der Eingeweidewürmer thierischer Körper. Blankenberg.

Goldschmidt (1905): Die Chromidien der Protozoen. in: Arch. f. Protistenk. Bd. V Heft 4.

Gonder (1905): Beiträge zur Kenntnis der Kernverhältnisse bei den in Cephalopoden schmarotzenden Infusorien. in: Arch. f. Protistenk. Bd. V.

Gould (1893): Notes on the minute structure of Pelomyxa palustris Greef. in: Quart. Journ. of Micr. Science Vol. 36.

Greef (1874): Pelomyxa palustris, ein amöbenartiger Organismus. in: Arch. f. mikr. Anat. Bd. 10.

Hamburger (1904): Die Conjugation von Paramaecium bursaria Focke. in: Arch. f. Protistenk. Bd. 4.

Hartmann (1907): Das System der Protozoen. in: Arch. f. Protistenk. Bd. 10.

Hartmann & v. Prowazek (1907): Blepharoplast, Caryosom und Centrosom. in: Arch. f. Protistenk. Bd. X.

Hartog (1906): Protozoa. in: Cambridge Natural History Vol. I. London.

Heidenhain (1907): Plasma und Zelle. Jena.

Hertwig, R. (1889): Über die Conjugation der Infusorien. in: Abh. d. bayr. Akad. d. Wiss. II. Cl. Bd. XVII.

— (1898): Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium. in: Abh. d. k. bayer. Akad. Wiss. XIX, 2.

— (1899): Was veranlaßt die Befruchtung der Protozoen? in: Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. in München.

— (1907): Über den Chromidialapparat und den Dualismus der Kernsubstanzen. in: Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. in München.

Hickson (1903): Protozoa, Infusoria. in: A Treatise on Zoology, edited by E. Ray Lankester Vol. I. London.

Ischikawa (1899): Further observations on the nuclear division of Noctiluca. in: Journ. Coll. Science Tokyo Vol. 6.

Jennings (1899): Studies on reactions to stimuli in unicellular organismes. II. The mechanism of the motor reactions of Paramaecium. in: Amer. Journ Physiol. II p. 311.

— (1906): Behaviour of the lower organisms. New York 1906.

Joseph (1907): Beobachtungen über die Kernverhältnisse von Loxodes rostrum O. F. M. in: Arch. f. Protistenk. Bd. 8.

Kent (1881—1882): A Manual of the Infusoria. Vol. II. London.

Keuten (1895): Die Kernteilung von Euglena viridis. in: Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. LX.

Klebs (1883): Über die Organisation einiger Flagellatengruppen. Botan. Inst. Tübingen I, 1.

Kölliker (1864): Icones histologicae, oder Atlas der vergleichenden Gewebelehre. I. Bd. Der feinere Bau der Protozoen. Leipzig.

Kölliker (1885): Die Bedeutung der Zellkerne für die Vorgänge der Vererbung. in: Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. XLII p. 23.

Kölsch (1902): Untersuchungen über die Zerfließungserscheinungen der ciliaten Infusorien (nebst Bemerkungen über Protoplasmastruktur, Protoplasmabewegungen und Vitalfärbungen). in: Zool. Jahrh., Abt. f. Anat. u. Antol. Bd. 16.

Krukenberg (1882): Grundzüge einer vergleichenden Physiologie der Verdauung. Heidelberg.

Kühne (1859): Untersuchungen über Bewegungen und Veränderungen der contractilen Substanzen. IV. Die Veränderungen der contractilen Substanz nach dem Tode. in: Arch. f. Anat. u. Physiol. Jahrg 1859.

Kunstler & Gineste (1902): Notice préliminaire sur l'Opaline dimidiate. in: Bibliographie anatomique T. 10.

— — (1905) Les sphérules trophoplasmique des infusoires ciliés. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 141.

— — (1906 a): Contribution a la morphologie generale des Protozoaires supérieurs. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 142.

— — (1906 b): Les cultures de Protozoaires et ces variations de la matière vivante. in: Compt rend. Acad. Sc. Paris T. 142.

— — (1906 c): L'orientation du corps des Opalines. in: Compt. rend. Soc. Biol. Paris T. 61.

Lang (1901): Lehrbuch der vergleichenden Anatomie der wirbellosen Tiere. 2. Aufl. 2. Liefg. Protozoa.

Lankester (1870): Remarks on Opalina and its contractile vesicles. in: Quart. Journ. Micr. Sci. n. s. Vol. X.

de Lannesan (1882): Traité de Zoologie. Paris.

Leeuwenhoek (1685): Outledingen en Ontdekkingen.

— (1722): Opera omnia, seu Arcana naturae ope exactissimorum microscopiorum detecta, experimentis variis comprohata. Lugduni Batavorum.

Lefevre (1903): A new method of embedding small objects. in: Journ. Applied Microscopy Vol. V p. 2080—2081.

Léger & Duboscq (1904 a): Notes sur les infusoires endoparasites. I. Les Astomata represent-ils un groupe naturel? in: Arch. de Zool. expér. et gén., Notes et revue, 4e série T. 2.

— — (1904 b): Notes sur les infusoires endoparasites. II. Anoplophrya brasili L. & D. III. Opalina saturnalis L. & D. in: Arch. Zool. expér. et gén. 4e série T. 2.

Leydig (1857): Lehrbuch der Histologie des Menschen und der Tiere. Frankfurt.

Loeb & Budgett (1897): Zur Theorie des Galvanotropismus. in: Arch. f. Anat. u. Physiol. Bd. 65.

Loewenthal (1904): Das Auftreten eines Micronucleus-artigen Gebildes bei Opalina ranarum. in: Arch. f. Protistenk. Bd. III 1904.

— (1908): Notizen über Opalina ranarum nebst Bemerkungen über die Untersuchung von Erythro- und Cyanochromatin. in: Arch. f. Protistenk. Bd. XIII.

Macfarland (1897): Celluläre Studien an Mollusken-Eier. in: Zool. Jahrh., Abt. f. Anat. u. Ontog. Bd. X.

Maier (1903): Über den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien. in: Arch. f. Protistenk. Bd. II.

Maupas (1885): Sur le glycogène chez les infusoires ciliés. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 101.

Maupas (1886): Sur les granules amylaries du cytosome des Gregarines. in: Compt. rend. Acad. Sc. Paris T. 102.
Mayer (1907): Über die Einbettung kleiner Objekte zum Schneiden. in: Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. u. mikr. Technik Bd. XXIV.
Metcalf (1907 *a*): Studies on Opalina (Preliminary Notice). in: Zool. Anz. Bd. 32 Nr. 3/4.
— (1907 *b* and *c*): The Excretory Organs of Opalina. Parts I and II. in: Arch. f. Protistenk. Bd. X.
Meves (1899 *a*): Über den Einfluß der Zellteilung auf den Sekretionsvorgang, nach Beobachtungen an der Niere der Salamanderlarve. in: Festschrift zum 70. Geburtstag von Carl v. Kupffer. Jena.
— (1899 *b*): Über Struktur und Histogenese der Samenfäden des Meerschweinchens. in: Arch. f. mikr. Anat. u. Entwicklungsgesch. Bd. 54.
Müller, O. F. (1786): Animalcula infusoria fluviat. et marina. Leipzig.
Neresheimer (1906): Der Zeugungskreis von Opalina. in: Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 22, also in: Münch. med. Wochenschr. Nr. 36 4. Sept. 1906.
— (1907): Die Fortpflanzung der Opalinen. in: Arch. f. Protistenk., Suppl. I 1907.
— (1908): Der Zeugungskreis des Ichthyophthirius. in: Ber. d. k. bayr. Biol. Versuchsstation in München Bd. I.
Nussbaum (1884): Über spontane u. künstliche Zellteilung. in: Sitz.-Ber. d. Niederrh. Ges. f. Natur- u. Heilkunde Bonn 1884 p. 259.
— (1886): Über die Teilarbeit der lebendigen Materie. I. Mitteilung. Die spontane und künstliche Teilung der Infusorien. in: Arch. f. mikr. Anat. Bd. 26 p. 487.
Pagenstecker (1857): Trematodenlarven und Trematoden. Heidelberg.
Parker (1891 and subsequent editions): Elementary Biology.
Parker & Haswell (1897): A Text Book of Zoology. London.
Perrier (1893): Traité de Zoologie. Paris.
Perty (1852): Zur Kenntnis kleinster Lebensformen. Bern.
Peter (1899): Das Centrum für die Flimmer- und Geißelbewegung. in: Anat. Anz. XV 14/15.
Pfitzner (1886): Zur Kenntnis der Kernteilung bei den Protozoen. in: Morphol. Jahrb Bd. 11.
Prandtl (1905): Reduktion und Caryogamie bei Infusorien. in: Biol. Centralbl. Bd. 25.
— (1906): Die Conjugation von Didinium nasutum O. F. M. in: Arch. f. Protistenk. Bd. VII.
Pritchard (1861): A History of Infusoria. London. p. 267, 569. Plate XXVI Figs. 28, 29.
von Prowazek (1898): Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. in: Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 63.
— (1905): Studien über Säugetiertrypanosomen. in: Arb. a. d. kais. Gesundheitsamte Bd. XXII.
Purkinje & Valentin (1835): De phenomeno generali et fundamentali motus vibratorii. Vratislaviae.
Pütter (1900): Studien über Thigmotaxis bei Protisten. in: Arch. f. Anat. u. Phys., Physiol. Abt., Suppl.-Bd. 1900.
— (1905): Die Atmung der Protozoen. in: Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. V.
Quennerstedt (1865): Bidrag til sveriges infusoriefauna. in: Acta universit. Lundensis T. II.

SALVIN-MOORE & BREINL (1907): The Cytology of the Trypanosomes. in: Annals of Tropical Medicine and Parasitology Vol. I.

SCHAUDINN (1894): Über Kernteilnng mit nachfolgender Körperteilnng bei Amoeba crystalligera GRUBER. in: Sitz.-Ber. d. Akad. d. Wiss. zu Berlin.

— (1896a): Über das Centralkorn der Heliozoen. Ein Beitrag zur Centrosomenfrage. in: Verb. d. dentsch. Zool. Ges.

— (1896b): Über den Zengnngskreis von Paramoeba eilbardi. in: Sitz.-Ber. d. Akad. d. Wiss. Berlin 1896 I.

— (1904): Generations- nnd Wirtswechsel bei Trypanosoma nnd Spirochaete. in: Arb. a. d. kais. Gesundbeitsamte Bd. XX.

SCHNEIDER (1906): Plasmastrnktnr nnd -Bewegung bei Protozoen und Pflanzenzellen. in: Arh. a. d. Zool. Inst. der Univ. Wien Bd. XVI.

SCHOUTEDEN (1905): Längsteilnng bei Opalina ranarum. in: Zool. Anz. Bd. 28.

SCHRANK (1803): Fanna boica. III, 2. Landshnt.

SCHUBOTZ (1908): Pycnothrix monocystrides nov. gen., nov. spec. in: Denkschr. d. med-naturw. Ges. Jena Bd. XIII.

SCHULTZE, MAX (1851): Beiträge zur Natnrgeschichte der Turbellarien. Greifswald.

VON SIEBOLD (1835): Helminthologische Beiträge. in: Arch. f. Natnrgesch. Bd. I.

STATKEWITSCH (1904): Galvanotropismns nnd Galvanotaxis der Ciliaten. I. Mitteilung. in: Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. IV.

— (1905): Idem. II. Mitteilnng. Reaktion der Wimpern — die Grnnderscheinnng des Galvanotropismns der Protisten. in: Zeitschr. f. allgem. Physiol. Bd. V.

STEIN (read 1856, pnblished 1859): Über die ihm bis jetzt hekannt gewordenen nnd von ihm genaner erforschten Infnsorien, welche im Innern von anderen Tieren eine parasitische Lebensweise führen. in: Ahh. k. böhm. Ges. Bd. X.

— (1859): Der Organismus der Infnsionstiere nach eigenen Forschnngen in systematischer Reihenfolge bearbeitet. I. Abt.: Die hypotrichen Infusionsthiere. Leipzig.

— (1860): Über die Einteilnng der holotrichen Infusionstiere: nene Gattungen und Arten dieser Ordnung. in: Sitz.-Ber. der k. böhm. Ges. d. Wiss. in Prag Jahrg. 1860 p. 56.

— (1867): Der Organismns der Infnsionstiere. Bd. II. Leipzig.

STOKES (1884): Notice of some new parasitic Infusoria. in: Amer. Natnralist. Vol. XVIII p. 1081—86.

STOLC (1900): Beobacbtnngen nnd Versuche über die Verdanung und Bildung der Kohlehydrate in einem amöbenartigen Organismns, Pelomyxa palustris GREEF. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 68.

TÖNNIGES (1898): Die feineren Banverhältnisse von Opalina ranarum. in: Sitz.-Ber. d. Ges. z. Beförd. d. ges. Natnrw. zn Marbnrg Jahrg. 1898.

— (1899): Nachtrag zn den Untersnchnngen über die feineren Banverhältnisse von Opalina ranarnm. Ibid. Jahrg. 1899.

VENEZIANI (1904): Über die physiologische Einwirknng des Radinms anf die Opalina ranarum. in: Centralbl. f. Physiol. Bd. 18 1904.

VERWORN (1889): Psycho-physiologische Protisten-Stndien. Jena.

— (1890): Die polare Erregung der Protisten dnrch den galvanischen Strom. In: Arcb. f. d. ges. Pbysiol. Bd 46.

— (1896): Untersnchnngen über die polare Erregnng der lehendigen Snbstanz dnrcb den konstanten Strom. III. Mitteilnng. in: Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 62.

Wallengren (1903): Zur Kenntnis der Galvanotaxie. I. Die anodische Galvanotaxis. in: Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. II.
Wilson, E. B. (1895): Archoplasm, Centrosome and Chromatin in the Sea Urchin Egg. in: Journ. of Morphol. XI.
— (1900): The Cell in Development and Inheritance. New York.
Yatsu (1904): On the Use of "Sea Lettuce" (Ulva). in: Orienting Small Objects for Sectioning. in: Journ. of Applied Microscopy Vol. VI No. 12.
Zeller (1877): Untersuchungen über die Fortpflanzung und Entwicklung der in unseren Batrachiern schmarotzenden Opalinen. in: Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. XXIX 1877.

Explanation of Plates.

All figures are camera drawings unless otherwise indicated. The degree of accuracy of all figures is told. When nothing is said as to accuracy, everything shown is carefully drawn with the camera; omissions are not always noted. Drawings from acetic-carmine preparations cannot show fine details for the stain does not bring out the finer structure.

Plate XIV.

Fig. 1. A schematic drawing of an optical longitudinal section of *O. intestinalis*, showing cilia, basal granules of cilia, ectosarc with ectosarc spherules (gray), endosarc with endosarc spherules (black), axial excretory organ, two nuclei (connected by a thread) each containing eight chromosomes. In the posterior nucleus is seen the vacuolated nucleolus.

Fig. 2. Part of a tangential section (superficial) of *O. ranarum*. Two rows of basal granules of the cilia are shown. Above each of these rows is a fibril which probably connects the outer ends of the basal granules. Transverse fibrils, at a little lower level than the last, run between the basal granules. The two longitudinal striae between the rows of basal granules are probably ridges in the pellicula. Where they cross over the transverse fibrils one sees a misleading hazy appearance of granules which do not exist. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 4100 diameters.

Fig. 3. Part of an oblique section of *O. intestinalis*, showing cilia (diagrammatically drawn), pellicula, basal granules of cilia, five alveoles of the ectosarc, two ectosarc spherules with contained granules, and two endosarc spherules with contained granules. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 2000 diameters.

Fig. 4. A cross section of *O. intestinalis*, showing the endosarc spherules (black) and the ectosarc spherules (gray). No attempt to indicate protoplasmic structure is made, merely the large alveoles of the ectosarc being drawn. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (but little extracted). × 1485 diameters.

Fig. 5. Part of a longitudinal section of *O. intestinalis*, showing cilia (slightly diagrammatic), basal granules of cilia, granular spherules in ectosarc and endosarc, cytoplasmic granules, nucleus with three large granular masses of chromatin and granular achromatic foam, also three chromatin spherules seeming about to be extruded from the nucleus. The small faintly stained spherical body in the nucleus is probably a partly dissolved chromatin spherule. The arrows in-

dicate the boundary between ectosarc and endosarc. Coros. suhl.-acetic acid, iron haematoxylin (well extracted). × 2000 diameters.

Fig. 6. Part of a cross section of *O. obtrigona*, showing cilia (semi-diagrammatic), pellicnla, rows of basal granules of cilia, large alveoles of ectosarc containing finely granular ectosarc sphernles (gray), granular endosarc spherules (more darkly stained) each in an alveole (some of these endosarc sphernles lie in strands of endoplasma which have pushed out into the ectosarc), three nuclei in two of which one sees masses of chromatin lying against the nnclear membrane, while all show the superficial network of cbromatin with nodal thickenings. The achromatic strnctnres in the nuclei are not drawn, and the fine-meshed cytoplasm is hnt conventionally shown as grannlar. Some of the rows of basal granules and cilia are donble because the rows are dividing where the body broadens, so as to cover the broader body snrface. Coros. subl.-acetic acid, iron baematoxylin (well extracted). × 2000 diameters.

Fig. 7. Part of an obliqne section of *O. intestinalis*, showing pellicnla, well stained ectosarc sphernles (some grannlar), unstained endosarc spherules looking like vacuoles, and nncleus. The bonndaries between the different alveoles of the ectosarc were not well shown, nor was the strnctnre of the endosarc clear. Coros. subl.-acetic acid, dahlia. × 2000 diameters.

Fig. 8. Part of an obliqne section of *O. intestinalis*, showing pellicula (its ridges are drawn at the left of the figure), basal granules of cilia, snb-pellicular layer of ectosarc, and the alveolar layer of ectosarc, each alveole containing one ectosarc spherule. Coros. subl.-acetic acid, methyl violet. × 2000 diameters.

Fig. 9. Three ectosarc sphernles from a section of *O. intestinalis*. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (not mnch extracted). × 2000 diameters.

Fig. 10. Ten endosarc spherules from the same animal as in Fig. 9. The last two spherules show the not infreqnent dnmb-hell shape. The last spherule shows superficial grannles. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (not much extracted). × 2000 diameters.

Fig. 11. An endosarc spherule from a section of *O. obtrigona*. This slender dnmbbell-shaped spherule shows the nearest approach to division I have fonnd in the endosarc sphernles of *Opalina*. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (not well extracted). × 2860 diameters.

Fig. 12. Five endosarc sphernles from a section of *O. ranarum*, showing internal (alveolar?) structnre. In each instance the left side of the figure representa the side of the spherule toward the outer surface of the body. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (long extracted). × 2860 diameters.

Fig. 13. Five endosarc spberules from a section of *O. intestinalis*. All are from the same animal, yet one sees that they are differently stained, indicating difference of condition. Coros. snbl.-acetic acid, iron haematoxylin (not mnch extracted). × 2000 diameters.

Fig. 14. Six ectosarc spherules from the same animal as in Fig. 13. This animal was considerably shrnnken and the spherules of the ectosarc and endosarc were also. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin (not much extracted). × 2000 diameters.

Fig. 15. A bit of nnnsually coarse-meshed endoplasmic foam from a section of *O. caudata*. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1485 diameters.

Fig. 16. A bit of endosarc from a section of *O. intestinalis*, showing that each endosarc spherule lies in an alveolus. The structure of the endoplasma is not well shown. Coros. subl.-acetic acid, Ehrlich's triacid mixture. × 2000 diameters.

Fig. 17. An optical section of the posterior end of a slender *O. dimidiata*, showing part of the excretory organ. One nucleus, in mitosis, lies surrounded by the excretory vacuoles. Only the upper half of this nucleus is drawn. Ten (?) or twelve rows of chromatin granules (chromosomes) were present. The general cytoplasmic foam is not shown. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1420 diameters.

Plate XV.

Opalina intestinalis (Figs. 18—31) and *O. dimidiata* (Fig. 31 *a*).

Fig. 18. Part of a section stained with methylen blue. Pellicula pale blue, ectosarc films and spherules green, endoplasma blue (structure very obscure and not shown), endosarc spherules unstained appearing like vacuoles, nuclear membrane blue, nuclear contents not shown, except the nucleolus (pale greenish blue with a dark blue vacuolated cap). Coros. subl.-acetic acid, methylen blue. × 2000 diameters.

Fig. 19. Another nucleolus from the same preparation as Fig. 18, but with two dark blue unvacuolated caps. × 2000 diameters.

Fig. 20. An individual stained intra-vitam with toluidin blue. The ectosarc spherules are stained, the endosarc spherules unstained. The band of ectosarc spherules shown crossing the cell in front of the posterior nucleus is superficial and is half of a complete ring. Very darkly stained bodies of a problematic nature are shown. The nuclei were entirely unstained until after all motion of the cilia ceased. Then certain masses (of chromatin?) began to stain as indicated. This individual was in an early stage of transverse division. × 500 diameters.

Figs. 21 and 22. Two sections showing the whole of one nucleus, stained with safranin and light green. The heavily stained red spherules are chromatin spherules. The chromosomes are paler red and granular. (The granules were not drawn with the camera. They should be one-half larger and one-third less numerous.) The achromatic granules and the large nucleolus are green. Neither the chromatin network nor the achromatic films were clearly enough seen to draw. The former was composed of extremely delicate threads. Coros. subl.-acetic acid. × 2000 diameters.

Fig. 23. Part of a section stained with safranin and light green, showing cilia, outer contour of pellicula, basal granules of cilia, ectosarc with coarser and finer fibrillae or films (green, semi-diagrammatic) and green-stained spherules, endosarc with pink-stained spherules and coarser and finer fibrillae and films (These are stained green in this preparation. If left a moment longer in absolute alcohol they would be red. It was impossible to draw these with entire accuracy), nucleus with chromatin masses and threads stained red, and the achromatic structures green. The three faint red bodies in the nucleus are probably dissolving chromatin spherules. All the nuclear structures shown (accurately drawn) lie near the upper, uncut, surface of the nucleus. The nucleolus is not in this section. Coros. subl.-acetic acid. × 2000 diameters.

Fig. 24. A longitudinal section of a nucleus in a late telophase of mitosis. Only a portion of the achromatic granules present are drawn. The nucleolus is not in this section. Coros. subl.-acetic acid, safranin and light green. × 2000 diameters.

Fig. 25. A section of another nucleus similarly preserved and stained. The chief lines of achromatic granules at the upper surface of the section are accurately shown; the other granules are drawn free hand. × 2000 diameters.

Figs. 26 and 27. Sections of other nuclei in which the fibrillar structures were more clearly seen. In Fig. 27 the achromatic granules and films lying beneath the chromatin net in the center of the nucleus are not drawn. Coros. subl.-acetic acid, safranin and light green. × 2000 diameters.

Figs. 28—31. Four sections showing the whole of one nucleus and, in Fig. 29, part of the cytoplasm. The chromatin spherules are numerous; the nucleolus is vacuolated. Except the very delicate chromatin net, which was difficult to see, all the chromatin structures present are drawn. In Fig. 29 the thickness of the pellicula (green) is uncertain, for the section was a little oblique. The interruption of the pellicula, as shown, was undoubted. Ectosarc films, granules, fibrils (?) and spherules, green; endosarc spherules pink; endosarc granules, films and fibrils (?), green. × 2000 diameters.

Fig. 31 *a*. On optical section of a macrogamete or macrogamete parent cell of *O. dimidiata* from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 19½ hours. The ectosarc spherules are yellow, the endosarc spherules red. The nuclei are not drawn. Acetic-carmine. × 1010 diameters.

Plate XVI.

Living Opalina intestinalis.

Except in Fig. 34, the anterior end of each nucleus in toward the top of the plate.

Fig. 32. The anterior end of a daughter cell whose nucleus is in a telophase of mitosis. Only the nuclear structure is shown. This was the posterior nucleus of the parent cell, as is indicated by its pointed anterior end. Eight chromosomes are seen in the anterior end of the nucleus; in the posterior end but seven can be seen, the eighth lying in the lower half of the nucleus below the right hand chromosome of the upper group of four. All the structures in the nucleus were remarkably clear, as clear as in the best stained preparations. The achromatic granules of only the upper half of the nucleus are shown, except that in the anterior end of the nucleus two rows of granules at a lower level are also drawn. × 1010 diameters.

Fig. 33. A nucleus drawn five to forty-five minutes after active swimming movements of the animal ceased, the cilia being then but slightly active. The granules of only the upper third of the nucleus are drawn. A few endosarc spherules and large granules of the cytoplasm are drawn for comparison. Eight chromosomes are seen in the anterior nucleus; three of those in the posterior nucleus are hidden. This nucleus was later almost completely isolated from the body, being held at one end by part of the broken body. It withstood uninjured the most violent currents produced by intermittent pressure on the cover-glass and after three days was entirely unchanged, except that the chromosomes seemed more nearly spherical and the achromatic granules were lies refractive, some having disappeared. × 1485 diameters.

Fig. 34. A pair of nuclei from an animal with active cilia, which was held immovable by pressure between a hair and the cover-glass. Eighteen hours after all movements of the cilia ceased the nuclei were in the same condition. Eight (or nine) distinct chromatin masses are in the anterior nucleus (one chromosome

has constricted or is constricting into two); in the other nucleus the chromosomes are already united into a ribbon. The difference in condition in the two nuclei is greater than usual, but is apparently not abnormal. The achromatic granules, in this case, were not carefully counted or drawn with entire accuracy. × 1010 diameters.

Fig. 35. A pair of nuclei connected by a bent and somewhat spiral thread. In the anterior nucleus seventeen chromatin (?) masses (one may be the nucleolus) are seen, also several spindle fibers which were remarkably clear. This is an early prophase of mitosis. × 1010 diameters.

Fig. 36. The posterior nucleus of a binucleated individual, in a late anaphase of mitosis. Eight chromosomes are in each end. But few of the spindle fibres were clear enough to draw and even these showed only faintly. The achromatic granules of only the upper half of the nucleus are shown. These were unusually large and were irregular in shape, a fact difficult to show in a drawing at this scale. × 1485 diameters.

Fig. 37. A pair of nuclei connected by a very long and irregularly bent thread. Fourteen to sixteen chromatin masses are shown in the anterior nucleus, in the posterior nucleus the chromatin ribbon is still incompletely fragmented. Almost none of the achromatic granules in the anterior nucleus are drawn. In the posterior nucleus only the larger achromatic granules are shown. × 1010 diameters.

Plate XVII.

Opalina intestinalis.

Longitudinal division Figs. 38—43, transverse division Fig. 44.

In drawings at this scale the nuclear phenomena cannot be accurately shown.

Fig. 38. A very early stage of division, the anterior end of the body showing merely a slight indentation. The nuclei are in a late anaphase of mitosis. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 460 diameters.

Fig. 39. A little later stage of division. The nuclei are in a late anaphase of mitosis. Coros subl.-acetic acid, borax carmine. × 460 diameters.

Fig. 40. A still later stage of division The nuclei are in a late anaphase of mitosis. Both anterior and posterior ends of the body are dividing. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 460 diameters.

Fig. 41 A dividing individual, slightly abnormal, having been kept four days in Lock's fluid before killing. The nuclei are in a late telophase of mitosis. The body should before this have completely divided. The general form of the body, however, well represents the usual normal manner of division. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 460 diameters.

Fig. 42. An almost completely divided individual. The nuclei are in an early telophase. This individual had been kept three days in sodium chloride solution before killing Probably under normal conditions division would have been completed before the nuclei reached this stage. The general form is exactly similar to what is found in entirely normal animals in a late stage of division. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 460 diameters

Fig. 43. A daughter cell fresh from division, as is shown by the irregular contour of one side of the body where it was connected with its sister cell (compare Fig. 40). The nucleus is in a rather late anaphase, as is usual in such young daughter cells. This cell has received the posterior nucleus from the parent,

as is shown by its position (compare Figs. 40—42). Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 460 diameters.

Fig. 44. An individual in transverse division. The nuclei are in an anaphase of mitosis. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 460 diameters.

Plate XVIII.

Opalina intestinalis.

All figures are reduced one-fifth, to the magnification indicated.

Fig. 45. An individual with two nuclei each in a prophase of mitosis. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. Drawn at 1010 diameters, reduced to 808 diameters.

Figs. 46—48. Three optical sections, through the upper, middle and lower thirds respectively, of the posterior nucleus shown in Fig. 45. In Fig. 46 most of the fibrils shown belong to the chromatin network. In Fig 47 the varicose fibrils in the center of the figure are optical sections of the films of the achromatic foam. In Fig. 48 only the chromatin masses and a few of the chromatin fibres are shown. × 1600 diameters.

Fig. 49. An individual with two nuclei in an early stage of mitosis. Especially in the posterior nucleus, one sees that the chromosomes are arranging themselves in two adequatorial rows preparatory to migration to the poles of the nucleus. The distinct and rather coarse fibers are fibers of the chromatin spindle. Most of the achromatic structures and the finer chromatin threads are omitted. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters.

Figs. 50—52. Three optical sections, through the upper, middle and lower thirds respectively of the posterior nucleus shown in Fig. 49. The coarse varicose longitudinal chromatin fibres of the spindle are well seen in Fig. 50. Fig. 51 shows the emarginate form of the ends of the chromatin spindle (compare Fig. 49). Fig. 52 shows that not all of the chromosomes have yet been formed from the chromatin ribbon (spireme). The achromatic structures lying in the deeper layer of the upper third of the nucleus are omitted from Fig 50. In Figs. 50 and 51 one sees that the chief longitudinal fibres of the chromatin spindle are attached to each pole of the nuclear membrane. The nucleolus lies in the lower part of Fig. 52. It is darkly shaded, not because it was heavily stained, but to make it seem to lie near the top of the section. × 1600 diameters.

Fig. 53. An individual with its nuclei each in an anaphase of mitosis. Eight chromosomes were present in each end of each nucleus. Most of the achromatic structures and the finer chromatin fibres are omitted in each nucleus. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 54. A daughter cell with its single nucleus in a late anaphase of mitosis. Some of the chromosomes are constricted transversely into two unequal portions (compare Fig. 53). All structures are omitted except the chromosomes and the thickest chromatin fibres. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 55. A nucleus, in an anaphase of mitosis, in which the fibres of the chromatin spindle were more delicate, more numerous and less distinctly longitudinal than usual. Except in the center of the nucleus, the achromatic structures are omitted. Here some of the chromatin fibres are omitted, leaving a "window" through which the vacuolated nucleolus and the films of the achromatic foam are seen. The nucleolus is seen to lie in an enlarged alveolus of the achromatic foam,

whose fibres radiate from the surface of the nucleolus. Where they touch the nucleolus triangular nodal thickenings of the films are seen. The chromosomes are granular. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 56. A nucleolus with central vacuole and minute peripheral vacuoles. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 57. A nucleus showing characteristic enlargement of the ends of the longitudinal fibres of the chromatin spindle, only a small part of the structures in the nucleus are drawn. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig 58. A nucleus in an early telophase of mitosis. In one end of the nucleus two of the chromosomes have fused by sending out a broad band of chromatin which unites them. There are eight chromosomes in this end. At the other end two of the chromosomes are constricted each into two. None of these chromosomes are yet united as in the opposite end of the nucleus. At the centre of the nucleus are a few alveoles of the achromatic foam which stain more deeply than the rest and are probably filled with dissolved chromatin from the "chromatin spherules". With the exception of these alveoles, none of the achromatic structures in this nucleus are shown, and only the larger fibres of the chromatin net are drawn. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 59. A very thin transverse section of a nucleus, showing the chromosomes just beneath the nuclear membrane, also lines of achromatic granules, and four partially dissolved masses of chromatin ("chromatin spherules"). The finer details of the achromatic structures were not clear enough to draw. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 1188 diameters.

Plate XIX.

Opalina intestinalis.

All figures are reduced one-fifth, to the magnification indicated.

Fig. 60. A daughter cell with the nucleus in a late telophase of mitosis Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters.

Figs. 61—62. Two optical sections, through the upper and lower halves respectively, of the nucleus shown in Fig. 60. The chromosomes are seen to be united together by broad thin bands of chromatin. The transverse line near the upper end of Fig. 61 is a fold in the nuclear membrane. The finer chromatin fibres are not drawn nor are the fibres of the achromatic foam. Only a few of the achromatic granules are shown. The nucleolus is not drawn. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 63. An older daughter cell whose nucleus is nearly separated into two daugther nuclei, one of which shows eight distinct chromosomes, while in the other the chromosomes are mostly united as in Fig. 61. The drawing shows the chromosomes, the polar fibres connecting one set of these with the pole, and several faintly stained bodies, nearer the constricted center of the nucleus, which seem to be dissolving "chromatin spherules". Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters

Fig. 64. Outlines of the nucleus and anterior end of the body of another individual. × 404 diameters.

Fig. 65. The same nucleus as that shown in Fig. 64. It is in a late telophase of mitosis, the daughter nuclei, being nearly distinct. Eight chromosomes were present in each daughter nucleus, as was shown when the animal was

slightly rolled. These are all distinct. A few dissolving chromatin spherules are shown near the constricted end of each daughter nucleus. The nucleolus is not drawn. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 66. Outlines of the nuclei and anterior end of the body of another individual. × 404 diameters.

Fig. 67. The posterior of the two nuclei shown in Fig. 66. Only the granular chromatin ribbon and a little of the achromatic foam is shown. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 68. The anterior end of a binucleated individual, showing in each nucleus the chromatin ribbon beginning to break up into the chromosomes preparatory to the next mitosis. The achromatic granules are conventionally drawn. The nucleolus is not shown. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 69. A thin optical section through the posterior nucleus shown in Fig. 68. All the granules in the chromosomes and the achromatic granules and film-lines are accurately drawn, except that the level of some of the achromatic granules is not correctly shown. × 1600 diameters.

Fig. 70. The anterior end of an individual in whose nuclei the chromatin ribbon has apparently already constricted to form separate chromatin masses, although, from the short thread connecting them, the nuclei seem to be young. The chromatin masses of only the upper half of the nuclei are drawn. The spherical nucleolus is seen in the posterior nucleus. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 71. The anterior end of an individual with two nuclei. The chromatin masses of only the upper half of the nuclei are drawn. The spherical nucleolus is seen in the posterior nucleus. Chromatin spherules are forming from the chromatin masses. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 72. The anterior end of an individual with two nuclei in which the chromatin spherules are for the most part already separated from the chromatin masses. The old nucleolus is seen in the posterior nucleus. A new nucleolus is forming near the pointed end of the anterior nucleus. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 73. The old nucleolus and a single chromatin mass from a nucleus in a condition slightly earlier than that shown in Fig. 72. The chromatin mass is granular, as the chromosomes always are. The chromatin spherules, much larger than the chromatin granules, are about to be cast off. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 74. An injured daughter cell (posterior end broken) whose nucleus shows the only exception I have found to the rule that in this species the old nucleolus remains in the posterior daughter nucleus. In this case it is in the anterior daughter nucleus. No attempt is made in this small scale drawing to represent all the chromosomes. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 368 diameters.

Plate XX.

Opalina intestinalis and *O. caudata.*

All figures are reduced one-fifth, to the magnification indicated.

Figs. 75—80. *Opalina intestinalis.*

Fig. 75. The posterior nucleus of a binucleated individual, entering upon mitosis. Numerous faintly stained partially dissolved chromatin spherules are

shown. The achromatic structures (except the nucleolus), the finer threads of the chromatin net, and the details of form of the chromosomes are omitted from the figure. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 76. An individual with its nuclei in what may perhaps be called the resting condition. Only the chromatin masses and the larger vacuoles of the achromatic foam are shown. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin × 808 diameters.

Fig. 77. The posterior nucleus shown in Fig. 76. Only the achromatic foam and the chromatin masses are shown, the nucleolus and the chromatin net being omitted. × 1600 diameters.

Fig. 78. An anterior nucleus drawn to show a weakly stained chromatin spherule in a tubular process from the anterior end of the nucleus. The chromatin masses also are drawn. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 79. A nucleus similar to that drawn in Fig. 78, showing several partially dissolved (weakly stained) chromatin spherules, one of which lies in a projection from the anterior end of the nucleus. All achromatic structures and the chromatin net are omitted from the drawing. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 80. A dumbbell-shaped nucleus of a daughter cell. A few partially dissolved chromatin spherules are seen in each end of the nucleus. The chromatin net, the nucleolus, and all the other achromatic structures except a few granules are omitted from the drawing. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Figs. 81—92. *Opalina caudata.*

Fig. 81. An individual with each of its nuclei in a late anaphase of mitosis. Six chromosomes are seen in each end of each nucleus. The spherical bodies at the centers of the nuclei are the nucleoli. The achromatic foam and the finer fibres of the chromatin net are omitted from the figure. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 246 diameters.

Fig. 82. A daughter cell showing the nucleolus in the anterior daughter nucleus, and six chromosomes in each nucleus; some of these are already united preparatory to forming the chromatin ribbon. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 262 diameters.

Fig. 83. A section of a nucleus showing granular chromatin masses, some fibres of the chromatin network with darkly stained nodal thickenings, and some films and granules (lightly stained) of the achromatic foam. Observe that the granules in the chromatin masses are of various sizes and shapes. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 1188 diameters.

Fig. 84. Part of a section of a nucleus, showing one granular chromatin mass, and a few other granules probably achromatic. Near the nucleus is shown a single granular endosarc spherule. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 1188 diameters.

Fig. 85. Part of a longitudinal section, showing one nucleus and a little of the adjacent cytoplasm. This nucleus was in an anaphase of mitosis. In order to show more clearly the chromatin granules upon the chromatin net these are drawn much darker than the chromosomes and the fibres of the chromatin net.

In reality all were stained equally dark. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 86. A longitudinal section of a nucleus in a telophase of mitosis. Four of the chromosomes are seen to have at their edges rows of more or less elongated granules. These granules are not arranged in pairs. Most of the longitudinal fibres of chromatin are seen to be very granular. The finer chromatin threads and most of the achromatic structures are omitted. In this nucleus it was impossible to sharply distinguish between chromatin granules and achromatic granules. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 87. An abnormal individual showing a great lateral swelling in which the endosarc was evenly granular, and the ectosarc apparently structureless. There were no endosarc spherules in the swollen area. They were abundant in the rest of the body, but are not drawn. The finer structures of the nuclei were not clear enough to draw. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 404 diameters.

Fig. 88. A very stocky individual. In the nuclei only the chromosomes and chief chromatin fibres of the upper surface are shown. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 556 diameters.

Fig. 89. A very stocky and abnormal individual, with four nuclei each in a telophase of mitosis. Two of these, seen in end view, do not show their mitotic condition. In the right hand nucleus the chromatin is abnormally compact. In the nucleus in the middle most of the granules drawn are probably achromatic. In the other two nuclei only the chromosomes and the chief fibres of the chromatic spindle are drawn. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 556 diameters.

Fig. 90. An individual with almost completely degenerated nuclei. Coros.-subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 400 diameters.

Fig. 91. A probably abnormal individual with nuclei in a condition characteristic of the multi-nucleated *Opalinae*, but never, I think, found in normal individuals of *O. caudata*. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 808 diameters.

Fig. 92. An individual with abnormal nucleus. Coros. subl.-acetic acid, borax carmine. × 404 diameters.

Plate XXI.

Abnormalities, *Opalina intestinalis* and *O. obtrigona*.

All figures are reduced one-fifth, to the magnification indicated.

Figs. 93—98. *Opalina intestinalis*.

Fig. 93. Outlines of the nuclei and the anterior end of a young individual. × 404 diameters.

Fig. 94. The same nuclei as those shown in Fig. 93. The aggregation of the chromatin into large irregular masses is abnormal, although the animal was killed immediately after removal from the host. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1600 diameters.

Fig. 95. The anterior end of an individual where posterior nucleus is abnormal, as is shown by the aggregation of the chromatin into a few dense compact masses. This was first observed upon staining with acetic-carmine, after which the animal was stained with Delafield's haematoxylin and drawn. In the anterior

nucleus only the chromatin masses are drawn. Kept alive three days in 0,6% NaCl solution, acetic-carmine four hours, 0,6% NaCl solution 1/2 day, coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 404 diameters

Fig. 96. A small individual with a single abnormal nucleus. (Compare Plate XX Fig. 92.) Flemming's stronger fluid. Mayer's haemalum. × 368 diameters

Fig. 97. An individual kept alive three days in 0,6% NaCl solution. The shape of the body and the position of the nuclei are unusual and may be abnormal. In the nuclei, which were in a late anaphase of mitosis, the chromatin masses are not carefully drawn. At the posterior end of the body one sees a depression which marks the position of the excretory aperture, an ovoid mass of the excretory granules, and the enlarged posterior vesicle of the excretory organ. The method of preparation was the same as for the individual shown in Fig. 95. × 368 diameters.

Fig. 98. A dividing individual, still active after living $5^1/_2$ days in 0,6% NaCl solution. Division began the third day and the form of the body reached the condition shown upon that day; the animal remained apparently unchanged two days more and was then killed, stained and drawn. Three nuclei are in one daughter cell. The anterior daughter of one nuclear pair and the posterior daughter of the other are about to fuse. (In other instances more advanced stages of this fusion were found.) The four daughter nuclei seem normal; each has eight chromosomes; each posterior daughter nucleus contains a nucleolus. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 368 diameters.

Figs. 99—118. Abnormal *Opalina obtrigona*.

(Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. All figures × 1600 diameters, except Fig. 111 which is a free hand sketch on a slightly smaller scale.

Figs. 99—101. Nuclei seeming almost if not quite normal. The network with thickened nodes is superficial and is probably chromatin, but the achromatic foam (not drawn), filling the whole nucleus, presents much the same appearance. Each nucleus shows from two to six discoid masses of chromatin upon the nuclear membrane. The bodies which are lightly shaded are chromatin discs on the far side of the nucleus.

Figs. 102 and 103. Nuclei in which the chromatin plates upon the nuclear membrane are reticulate. In the center of each nucleus is a mass of granules probably chiefly achromatic. A little of the superficial, chromatin (?) net is shown and a little of the achromatic foam is drawn in Fig. 103. It is hardly distinguishable from the superficial net, except by its more central position and the smaller size of its meshes.

Fig. 104. A nucleus in which the chromatin in chiefly in two reticulate masses, in one of which a central refractive body is seen. The reticulation of the lower mass is not shown.

Figs. 105—109. Optical sections through nuclei showing similar conditions. In each is a central mass of granules probably chiefly achromatic and one or two bodies consisting of a central refractive sphere surrounded by a layer of chromatin which shows a denser net with more faintly staining interspaces. Bits of the achromatic foam are indicated in some of the figures.

Fig. 110. A nucleus in which the achromatic granules are in two masses connected by lines of similar granules. One sphere, with its chromatin either more compact or not well differentiated by the stain, is shown, as is also the achromatic foam.

Figs. 111—115. Optical sections of other nuclei in similar conditions. Note that in Fig. 111 there are two chromatin-covered spheres upon the pseudo-spindle.

Figs. 116 and 117. Nuclei which have almost completely degenerated, showing only one or two masses of debris within the still intact nuclear membrane.

Fig. 118. An optical section through a part of the body showing two nuclei and the remains of eight or nine others. In some cases merely an empty space marks the former position of a nucleus; in other cases one sees small spheres, the remains of the chromatin-covered spheres; in other cases there are left merely masses of debris representing the achromatic structures.

Plate XXII.

Opalina intestinalis. Figs. 137—139 *O. caudata.*

All figures reduced one-third, to the magnification indicated.

Fig. 119. A small individual with eight chromosomes, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 5 days. This *Opalina* passed unencysted through the alimentary canal of the tadpole. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 120. A small individual with four chromosomes, from the same tadpole. It passed unencysted through the alimentary canal of the tadpole. The reduced number of chromosomes is seen in animals of this size and smaller. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 121—128. Optical sections of minute individuals about ready for encystment, from the rectum of an adult *Bombinator pachypus*. Figs. 121 and 122 show respectively an early and a late stage of the last division before encystment. Observe that the nuclei are not in mitosis. In Figs. 122 and 123 the posterior end of the body shows a very delicate pellicula and numerous slight lobulations. In each nucleus the chromatin spheres are shown, and in most of them the group of achromatic granules is drawn. The cytoplasmic structure is either omitted or conventionally drawn. The ectosarc spherules are shown in Figs. 123 and 128. In Figs. 121, 126 and 127 probably the larger spherules belong to the ectosarc, the smaller to the endosarc. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 129. An optical section of an individual which had begun to encyst. Endosarc spherules (shaded, more abundant in the anterior part of the body) and a few ectosarc spherules (unshaded, in the posterior end of the body) are shown. The nuclear and cytoplasmic structure is not carefully drawn. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 130—132. Optical sections of cysts from the rectum of an adult *Bombinator pachypus*. In Fig. 130 the unusually small endosarc spherules are drawn. Fig. 131 shows one chromatin sphere in the nucleus, Fig. 132 shows three. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 133. The nucleus of another cyst from the same preparation, showing only the reticulate character of the superficial chromatin in the chromatin sphere. Acetic-carmine. × 1010 diameters.

Fig. 134. An optical section of a newly formed cyst with very delicate wall, from the same preparation. There are three chromatin spheres in the nucleus. The ectosarc spherules are at the outermost edge of the ectosarc. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 135. An optical section of another cyst from the same preparation. Most, perhaps all, of the ectosarc spherules have been extruded and lie between the body and the wall of the cyst. Acetic-carmine. × 990 diameters.

Fig. 136. An optical section of another cyst from the same preparation, showing in the nucleus one large and one small chromatin sphere and a central mass of granules. Between the cell body and the cyst wall is a mass of debris probably derived from degenerated ectosarc spherules. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 137—139. *Opalina caudata.* Sections (2 μ) of cysts from the rectum of an adult *Bombinator pachypus.* All of the nuclear structures present are accurately drawn. In Figs. 137 and 138 all of the chromatin seems to be gathered into the chromatin spheres. In Fig. 139, in addition to the chromatin sphere, ten small chromatin masses are seen. Others were present in the adjacent sections. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1334 diameters.

Figs. 140—143. Animals hatching from the cysts in the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus* five hours or less after ingestion of the cysts. Ectosarc spherules are shown (shaded) in Fig. 140. In the same figure granular debris is seen in the cyst. The boundary between ectosarc and endosarc is indicated by dotted lines. Most of the cilia were distroyed by the acetic acid and the currents caused in making the preparation; all which were seen are drawn. The details of nuclear structure were not well shown. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 144 and 145. Macrogametes or macrogamete parent-cells[1]) from the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 6 days. Few cilia were drawn in the original sketch for Fig. 144, the rest having been filled in later. The endosarc spherules are shown in Fig. 145. No nucleus was visible in this darkly stained animal. Possibly it had degenerated. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 146. A living dividing individual from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 60 hours. Endosarc spherules (shaded) and ectosarc spherules (unshaded) are shown. The nuclei were not clear. A second, more anterior, seemed to be present at a lower level, but I could not be sure of it. The long and sparse cilia make it probable that (after not less than two divisions) this individual would have given rise to microgametes. × 673 diameters.

Fig. 147. A free-hand sketch of a very active, dividing macrogamete mother-cell (it may be a parent-cell) from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 36 hours. The two daughter cells are of the same size. They were slightly flattened, one being seen more in edge view. Extruded excretory granules were seen dragging behind one daughter cell.

Figs. 148 and 149. Optical sections of macrogametes or macrogamete parent-cells from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 136 hours. But few cilia were in the original sketch for Fig. 148, the rest having been supplied later. Each nucleus shows four chromosomes. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 150. An optical section of a macrogamete from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 43 hours. Acetic-carmine. × 673 diameters.

---

[1]) I use the word parent-cell to indicate a cell which after one or more divisions will produce gametes. The word mother-cell is used for a cell whose next division will give rise to gametes. I realize that the phraseology is not satisfactory, but with the understanding that parent is entended to include grand parent or still earlier generations, it may do for the purposes of the present paper.

Fig. 151. An optical section of a macrogamete from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 6 days. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 152. A section (4 μ) of a macrogamete or macrogamete parent-cell in the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 24 hours. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 1334 diameters.

Fig 153. A living dividing gamete parent-cell from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 42 hours. Extruded excretory granules are seen at the posterior end of the body. The long and sparce cilia make it probable that (after not less than two divisions) this cell will give rise to microgametes. × 673 diameters.

Plate XXIII.

Opalina intestinalis.

All figures are reduced one-third, to the magnification indicated.

Fig. 154. A microgamete parent-cell from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours. The cilia are taken from a sketch of the living animal; the body form and nucleus were drawn after treatment with acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 155–158. Microgamete parent-cells from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours. In Fig. 155 parts of the excretory organ are seen. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 159. A living microgamete parent-cell in division, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours. The cilia are too short. × 1010 diameters.

Fig. 160. A living cell ready to metamorphose into a microgamete, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 42 hours. I suspect that the posterior two or three cilia were attached further forward than is shown, since the naked end of the tail is longer in the fully formed microgamete than in this animal as here drawn. × 673 diameters.

Figs. 161 and 162. Microgametes (the first mature, the second probably not so) whose tails are contracted by acetic-carmine; from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected 91 hours (Fig. 161) and 70 hours (Fig. 162). In Fig. 161 the endosarc spherules are drawn. × 673 diameters.

Fig. 163. A living microgamete from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 42 hours. Accurately drawn, except that the nuclear structure, which was not clear, is omitted. The endosarc spherules are shown. × 673 diameters.

Fig. 164. An early stage of copulation. From life. The animals were too active for drawing with the camera. The record of the infection from which these animals were obtained is lost. Some cilia have been added to the microgamete in the original sketch, which represented rather too thin an optical section. (*Cf.* Metcalf 1907*a*, Fig 3.)

Figs. 165—167 Later stages of copulation in different individuals from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 88 hours. Free hand drawings from life.

Fig. 168. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus* infected 88 hours. The nucleus of the male seemed to contain two chromatin masses of unequal size, but the staining was not sufficiently clear to determine accurately the structure. Probably the larger mass was composed of three chromosomes lying close together. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 169. An early stage of copulation, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours. Acetic-carmine. × 693 diameters.

Fig. 170. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 88 hours.

Fig. 171. A copulating pair from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 45 hours. The microgamete was the smallest I have seen of this species. Its nucleus was not visible. Drawn from life.

Fig. 172. A copulating pair from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 60 hours. Acetic-carmine. Magnification not recorded.

Fig. 173. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. The macrogamete is much larger than usual. Acetic acid. × 673 diameters.

Figs. 174—177. Successive stages of copulation, drawn from life: Fig. 174 at 12^{45} P. M., Fig. 175 at 1^{40} P. M., Fig. 176 at 1^{45} P. M, Fig. 177 at 1^{49} P. M. From a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours.

Fig. 178. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus* infected 70 hours. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 179 and 180. Two stages in the attempted copulation of a pair of gametes from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 70 hours. The microgamete was unusually large. Later it separated from the macrogamete and formed a pseudocyst. Drawn from life.

Fig. 181. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 91 hours. The microgamete is attached by the whole anterior half of its body, the tail remaining free. This is the only instance in which such a condition was seen. The preparation was inadvertently stained before I learned if the conjugation would become complete. From life. × 673 diameters.

Fig. 182. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. There are four chromosomes in the nucleus of the male and four in one end of the dividing nucleus of the female. In the other end of the nucleus of the female only two chromosomes were visible. Acetic-carmine, magnification not recorded.

Plate XXIV.

Opalina intestinalis.

All figures are reduced one-third to the magnification indicated.

Figs. 183—185 *a*. Copulating pairs in sections of the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 60 hours. Figs. 185 and 185 *a*, are from successive sections. The macrogamete shown in Fig. 183 was broken as indicated. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 990 diameters.

Fig. 186. A copulating pair from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 88 hours. One of the two anterior nuclei may be from the male. If so it passed by the posterior nucleus to reach its present position. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 187. A zygote, with the nuclei still unfused, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7½ days. Acetic acid. × 673 diameters.

Fig. 188. A zygote, with the nuclei ready to fuse, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. Acetic acid. × 673 diameters.

Fig. 189. A similar zygote from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 91 hours. Acetic-carmine. × 990 diameters.

Fig. 190. A section of a zygote from a tadpole of *Bombinator pachypus* infected 7 days. The two nuclei are still unfused. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. × 673 diameters.

Fig. 191. A section of a zygote from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 64 hours. The membrane between the two nuclei is broken down in the middle. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 990 diameters.

Fig. 192. A zygote, with nuclei marly fused, from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7½ days. The nuclear structure was not clearly seen. Acetic acid. × 673 diameters.

Fig. 193. A zygote from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7½ days. Acetic acid. × 673 diameters.

Figs. 194—196. Zygotes from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected respectirely 4¾ days, 5 days, 4¾ days. Each nucleus (syncarion) shows eight chromosomes. In the nucleus shown in Fig. 196 were two structures, of different refractive quality from the chromosomes, which may have been nucleoli or vacuoles, probably the latter. Figs. 194 and 196 acetic acid; Fig. 195 acetic-carmine. × 990 diameters.

Figs. 197—200. Zygotes formed by the fertilization of binucleated macrogametes. In each case the nucleus from the male lies between the two macrogamete nuclei. In Figs. 198—200 it is evident that the nucleus from the male will fuse, or is fusing (Fig. 200), with the anterior of the macrogamete nuclei. The first is an acetic acid preparation, the others are acetic-carmine preparation, from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected respectirely 7 days, 136 hours, 88 hours, 88 hours. Figs. 197, 199, 200 × 673 diameters; magnification of Fig. 198 not recorded.

Figs. 201—203. Binucleated zygotes, the anterior nuclei all being syncaria as is shown by their size and the number of their chromosomes. From tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. Acetic acid. × 673 diameters.

Fig. 204. A zygote formed by the union of a male with a binucleated female whose nuclei were in a telophase of mitosis. The nucleus from the male is also in mitosis. The radiations at its two ends are merely films of the cytoplasmic foam (compare the next figure). From an acetic-carmine preparation; this animal, however, lay in a part of the slide where only the acetic acid, and not the carmine, had taken effect. The preparation was very clear. From a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 106 hours. × 673 diameters.

Fig. 205. An optical section through the same animal, showing on a larger scale the nucleus from the male and the cytoplasm surrounding it. The nucleus lies in a vacuole of the cytoplasm, which it completely fills, its membrane being covered by a film of cytoplasm from which radiate other films. Where the radiating films join the film covering the nuclear membrane, granules are seen similar to those in the rest of the cytoplasm. The drawing — an ink copy of the original pencil drawing — is inaccurate, for these granules upon the nuclear contour should be shown as lying wholly outside (though abutting upon) the membrane. × 990 diameters.

Fig. 206. A daughter cell from the division of a zygote similar to that shown in Fig. 204; from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. Acetic acid. × 673 diameters.

Fig. 207. An unclear acetic-carmine preparation from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 91 hours. × 673 diameters.

Fig. 208. An acetic-acid preparation from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7 days. A spindle-shaped microgamete nucleus lay near what seemed to be four daughter nuclei. × 673 diameters.

Fig. 209. A living animal from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 88 hours. The nuclei were not perfectly clear. In the original free-hand sketch they are annotated with a question mark.

Plate XXV.

Opalina intestinalis.

All figures are reduced one-third, to the magnification indicated.

Figs. 210—218. Successive stages of copulation and pseudoencystment of a pair of gametes from a tadpole of *Bufo vulgaris*. Fig. 210 is a free-hand sketch from memory made immediately after the male become attached; the other figures × 673 diameters. From life.

Figs. 219—221. Pseudocysts from tadpoles of *Bombinator pachypus* (Figs. 219 and 221) and *Bufo vulgaris* (Fig. 220). In Fig. 219 four granular chromosomes are seen in each end of the dividing nucleus. The granules apparently were not arranged in pairs, their number in two of the chromosomes being uneven. In Fig. 220 each macrogamete nucleus had four chromosomes the uppermost two of which in each case showed distinct granules, so arranged however as not to be readily counted; the granules of the lower two chromosomes were less distinctly seen. The nucleus from the microgamete showed a single compact chromatin mass which contained a group of granules at one side. The excretory vacuole with faintly visible granules (in Brownian movement) is shown near the top of the figure. Fig. 219 from life, × 990 diameters; Fig. 220 from life, × 673 diameters; Fig. 221 acetic-carmine, × 673 diameters.

Figs. 222—225. Zygotes with peculiar spindle-shaped syncaria, from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected respectively 7½ days, 88 hours, 7 days, 113 hours. In Fig. 224 a vacuole of the excretory organ is shown in dotted outline. In Fig. 225 the large disc in the nucleus was probably not a nucleolus but a mass of chromatin. Figs. 222 and 224 acetic acid; Fig. 223 acetic-carmine; Fig. 225 from life. × 673 diameters.

Figs. 226 and 227. Zygotes whose daughter nuclei somewhat resemble the nuclei shown in Figs. 222 and 224; from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 7½ days. Acetic acid. × 673 diameters.

Figs. 228—235. Abnormal individuals from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected 43 hours (Fig. 228), 54 hours (Figs. 229—233), 91 hours (Fig. 234), and 114 hours (Fig. 235). These tadpoles were infected from two different lots of cysts, Figs. 229—233 being from one series of infections, Figs. 228, 234 and 235 from another. From life. Figs. 234 and 235 free-hand sketches; the rest camera drawings × 673 diameters.

Fig. 236. A section of an infection cyst from a tadpole of *Bombinator pachypus*. Coros. subl.-acetic acid, Delafield's haematoxylin. No record was made of the infection or of the magnification of the drawing.

Plate XXVI.

Opalina intestinalis and *O. caudata.*

All figures are reduced one-third, to the magnification indicated.

Figs. 237—247. *Opalina intestinalis.*

Figs. 237—239. Three sections of a small individual which passed unencysted through the alimentary canal into the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus.*

Large reticulate masses of chromatin and some smaller fragments are seen extruded from the nucleus and lying in the cytoplasm. Apparently the full number of chromosomes (8) were in these nuclei. Vacuoles around some of these masses are indicated by dotted contours. From a 6 day infection. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. Restaining with iron haematoxylin gave the same results. × 673 diameters.

Fig. 240. The anterior end of another individual from the same preparations, showing a reticulate mass of chromatin slightly displaced, probably by the microtome knife, from its position in the nucleus. × 673 diameters.

Fig. 241. A combination of three drawings from sections of an individual which had passed unencysted through the alimentary canal and had been six days in the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus*. Vacuoles, probably of the excretory system, are shown in dotted outline. Six masses of chromatin are seen lying in the cytoplasm. One of these is in the form of a reticulate layer partly surrounding a central refractive sphere (*cf.* the figures on Plate XXI). The nuclei contained the reduced number of chromosomes (4). Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 673 diameters.

Figs. 242—244. Successive sections from a small individual from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 6 days. Extruded masses of chromatin are seen in the cytoplasm. The animal may or may not have come from a cyst so for as its size would indicate. It seems probable, however, that animals with this type of chromidia passed unencysted through the alimentary canal. Four chromosomes are in each nucleus. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 673 diameters.

Figs. 245—247. The three central sections from a series of five through an individual from a tadpole of *Bombinator pachypus*, infected 6 days. Extruded masses of chromatin are seen in the cytoplasm near each of the two nuclei. The other two sections showed no such chromidia. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 673 diameters.

Figs. 248—262. *Opalina caudata*.

Figs. 248—250. Individuals which passed unencysted through the alimentary canal into the rectum of a tadpole of *Bombinator pachypus*; 118 hours infection. Excretory vacuoles are seen in each. In Fig. 248 the boundary between ectosarc and endosarc is indicated by a dotted line. In this figure there are shown twelve chromatin masses (chromosomes) in each nucleus which must be ready to enter upon mitosis. The other animals show the reduced number of chromosomes (3). Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 251. A section through a small individual from the rectum of an adult *Bombinator pachypus* which contained many infection cysts. In each nucleus are two chromatin spheres whose presence at this early stage is unusual. Coros. subl.-acetic acid, DELAFIELD's haematoxylin. × 673 diameters.

Figs. 252—256. Infection cysts from aquaria in which *Bombinator pachypus* was kept (Fig. 254 shows a cyst from the rectum of one of these adult Bombinator). Fig. 252 shows one chromatin sphere in the nucleus; Fig. 253 shows two chromatin spheres extruded into the cytoplasm and none in the nucleus; Fig. 254 shows a binucleated cyst with one chromatin sphere in one nucleus and none in the other; Fig. 255 shows a binucleated animal which encysted while in division; in Fig. 256 two animals are shown inside one cyst (one cannot be certain that they are entirely

separate; they may be connected by such delicate strands as are found uniting the daughter cells in late stages of division). Figs. 252—254 acetic-carmine; Figs. 255 and 256 from life. × 440 diameters.

Figs. 257 and 258. Macrogametes (Fig. 257 possibly a macrogamete parent-cell) from a tadpole of *Bombinator pachypus* (?), infected 22 hours. The first figure shows the usual size, the second the smallest size found. The ectosarc spherules are indicated. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 259. A microgamete from the same tadpole of *Bombinator pachypus* (?), infected 22 hours. Ectosarc spherules (unshaded) and endosarc spherules (shaded) are shown. In no other series of infections have I found apparently mature gametes before 42 hours after the beginning of infection. Acetic-carmine. × 990 diameters.

Fig. 260. A macrogamete (or macrogamete parent-cell?) from the same tadpole of *Bombinator pachypus* (?), infected 22 hours. The ectosarc spherules are shown. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 261. A living but almost quiescent microgamete. × 673 diameters. Infection data were not noted.

Fig. 262. A free-hand drawing of a living copulating pair from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 66 hours.

Plate XXVII

Opalina caudata and *Opalina dimidiata.*

All figures are reduced one-third, to the magnification indicated.

Figs. 263—276. *Opalina caudata.*

Fig. 263. A copulating pair from a tadpole of *Bufo vulgaris* infected 66 hours. The macrogamete is in division. Free-hand drawing.

Figs. 264—271. Examples of copulation in living animals from tadpoles of *Bombinator pachypus*, infected 60 hours. Fig. 265 shows a late stage of copulation; Figs. 269 and 270 show copulation while the macrogamete is in division; Fig. 271 shows two males attached to one female. Fig. 264 × 438 diameters; the other figures are free-hand drawings.

Figs. 272—274. Copulating pairs from a tadpole of *Bombinator pachypus* infected 60 hours. The endosarc spherules are drawn in Figs. 272 and 273. Each nucleus in Figs. 273 and 274 shows three chromosomes. The nature of the body just outside the microgamete nucleus in Fig 272 is uncertain. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 275. A pseudocyst (macrogamete?) from a tadpole of *Rana esculenta*, infected with both *O. caudata* and *O. intestinalis* by being placed for an hour in a jar with adult *Bombinator pachypus*. Cast off cilia and extruded globules lie around the pseudocyst. Each nucleus has three chromosomes. × 673 diameters.

Fig. 276. Abnormal copulation of two individuals of nearly similar size, the smaller of which showed a nucleus in division. Acetic-carmine. Infection data and the magnification were not noted.

Figs. 277—298. *Opalina dimidiata.*

Figs. 277—281. Minute individuals from a culture in 0,6 % NaCl solution, kept three days after removal of the animals from the rectum of an adult *Rana esculenta*. Division continued during this time and many of the animals became minute, as shown, and were apparently ready for encystment. Fig. 277 shows

some of the endosarc spherules present; in the cytoplasm only the larger granules are carefully drawn; the living animal was treated directly with Ehrlich's acid haematoxylin. Figs. 278—280 are acetic-carmine preparations; Fig. 279 shows apparently a chromatin sphere being extruted from the anterior nucleus. Fig. 281, Ehrlich's acid haematoxylin. All figures × 673 diameters.

Figs. 282—284. Spheroidal individuals, not true cysts, from a tadpole of *Rana esculenta*, infected 24 hours. From these apparently pseudocysts some of the endosarc spherules are being extruded. My notes on these drawings, as also my memory of them, are insufficient to explain the conditions shown. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 285—288. Infection cysts from tadpoles of *Bufo vulgaris*, naturally infected. The size of the cysts, their multinucleated condition, and the presence of free-swimming minute *Opalinae dimidiatae* in the same recta, show these to be cysts of *O. dimidiata*. Fig. 285, from a living cyst; the other figures from acetic-carmine preparations. × 673 diameters.

Figs. 289 – 291. Peculiarly shrunken individuals which passed unencysted through the alimentary canal and were lying in the rectum of a tadpole of *Rana esculenta*, infected 24 hours. Endosarc spherules (shaded) and ectosarc spherules (unshaded) are shown. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 292. An individual from a large tadpole of *Rana esculenta*, infected 24 hours. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 293. A living gamete parent-cell from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 6 hours. The endosarc spherules are shown. × 673 diameters.

Fig. 294. A living gamete parent-cell in division; from a tadpole of *Bufo vulgaris*, infected 36 hours. The endosarc spherules are shown. The granules shown as black were highly refractive. The condition of the nuclei is of interest. × 673 diameters.

Figs. 295—298. Macrogametes from a tadpole of *Rana esculenta*. × 673 diameters.

Plate XXVIII.

Opalina dimidiata and *Opalina ranarum*.

All figures are reduced one-third, to the magnification indicated.

Figs. 299—324. *Opalina dimidiata*.

Figs. 299—302. Gamete parent-cells from tadpoles of *Rana esculenta*, infected respectively 32 hours, time?, 97½ hours, 32 hours. Fig. 302 shows the endosarc spherules and also the extrusion of chromatin spheres from each nucleus. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 303. An individual from a tadpole (of a species not noted) infected 8 days. The structures in the elongated nuclei were not clearly seen. It is doubtful whether the animal was a gamete parent-cell with both nuclei in mitosis, or a zygote with its syncarion already divided into two. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 304. An individual from a tadpole of *Rana esculenta*, infected 80½ hours. Its nucleus was in mitosis. The nature of the bodies at the two ends of the spindle was not clear; they were probably chromatin spheres similar to those shown extruded from the larger nucleus in Fig. 309. The animal was probably a microgamete mother cell. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs 305 and 306. Macrogametes from a tadpole of *Rana esculenta*, infected $97^1/_2$ hours. In the second figure endosarc spherules are shown, and also a chromatin sphere extruded from the nucleus into the cytoplasm. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 307—309. Divisions in the formation of the microgametes; from a tadpole of *Rana esculenta*, infected $80^1/_2$ hours. The number of chromosomes seemed in some nuclei five, in others six. Probably six is the correct reduced number of chromosomes for *O. dimidiata*. Some of the nuclei were not sufficiently clear to draw and are left empty. In Fig. 309 the division may be abnormal, but in this species the nuclei are so independent of one another that the lack of synchronism in their division in this case may not indicate abnormal condition. The endosarc spherules are shown in all figures. From life. × 673 diameters.

Fig. 310. A living microgamete, with unusually long tail, from a tadpole of *Rana esculenta*, infected 8 days. There was no swelling at the tip of the tail such as is usually seen in microgametes in this and other species. × 673 diameters.

Fig. 311. An individual which seems to be a microgamete mother-cell, from a tadpole of *Bufo vulgaris*, naturally infected for at least three weeks. The tail is some what contracted by acetic carmine. Copulation was found among the Opalinas in this tadpole, this being by far the oldest infection in which copulation or microgametes were seen. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig 312. A living copulating pair from a tadpole of *Rana esculenta*, infected 98 hours. × 673 diameters.

Fig. 313. A pair of living individuals from a tadpole of *Rana esculenta*, infected $80^1/_2$ hours, showing a dividing microgamete mother-cell attached to another cell of about the same size. The manner of the attachment and the condition of the nuclei indicate that this was either a chance connection or an abnormal attempted copulation. There was no change after three-quarters of an hour. Free-hand drawing.

Figs. 314—318. Zygotes from tadpoles of unnoted species (probably *Rana esculenta*, otherevise the fact would have been noted), infected 7 days, except the host for the animal shown in Fig. 117, which was infected $97^1/_2$ hours. The nuclei were not sufficiently well stained to allow accurate drawing of the chromosomes or chromatin masses, which were so numerous as to obscure one another. The posterior nuclei shown in Figs. 315 and 316 are the syncaria. Possibly all the nuclei shown in Fig. 318 have come from the syncarion, the posterior daughter having completed a second division with which the anterior nucleus is still engaged; or the macrogamete may have contained originally three nuclei. The smaller size of the posterior nuclei makes the first interpretation much the more probable. The details of nuclear structure are not adequately shown. The chromatin masses were so numerous as to obscure one another. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 319. An individual from the same preparation as Fig. 318. The anterior nucleus from its shape would seem not to be a syncarion. It may be abnormal. The chromatin is not accurately drawn. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Fig. 320. Another individual from the same preparation, in which the anterior nucleus is the syncarion with the spindle form which persists until after at least one division. The chromatin could not be accurately drawn. Acetic-carmine. × 673 diameters

Figs. 321—324. Young individuals from tadpoles of *Bufo vulgaris*, naturally infected for an unknown period. Still larger individuals, with twice as many

nuclei irregularly arranged instead of in an axial row, were present in the same tadpoles. Acetic-carmine. × 673 diameters.

Figs. 325—327. *Opalina ranarum.*

Fig. 325. A minute individual ready for encystment, from the rectum of an adult *Rana temporaria*. The endosarc spherules (unshaded) are shown; cilia are not drawn because injured. The method of preparation was not noted, but the injury to the cilia makes it probable that acetic-carmine was used. × 673 diameters.

Fig. 326. A cyst from the same host. Cilia were present within the cyst but were too confused to draw. The method of preparation was not noted. × 673 diameters.

Fig. 327. A section of a zygote in the rectum of a tadpole of *Rana temporaria*. The nucleus is carefully drawn, as are also the endosarc spherules. Coros. subl.-acetic acid, iron haematoxylin. × 990 diameters.

Referate.

Breinl, A. and Hindle, E. — Contribution to the Morphology and Life History of *Piroplasma canis*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology Vol. II No. 3 1908.

B. und H. wenden das Färbungsverfahren von Breinl und die von ersterem angegebene Modifizierung der Heidenhain'schen Eisenhämatoxylinfärbung bei *Piroplasma canis* an. Sie beginnen mit der Beschreibung der ersten auftretenden Formen und verfolgen die Entwicklung bis kurz vor dem Tode des infizierten Tieres.

(Die vorliegende Arbeit gibt den vollkommenen Beweis der Richtigkeit der Schaudinn'schen Auffassung dieser Protozoen als doppelkernige Zellen. Die Entstehung des zweiten Kernes aus dem größeren Kern (Hauptkern), die Teilung desselben vor der des größeren und die manchmal beobachtete Geißel sprechen für die Flagellatennatur dieser Protozoen und die Einreihung in die Ordnung der Binucleaten [Hartmann]).

B. und H. beschreiben den größeren Kern als eine kleine kompakte, dunkel gefärbte Chromatinmasse, welche von einer Vacuole umgeben ist, die leicht gefärbte Substanz enthält. (Es handelt sich wahrscheinlich nicht um eine Vacuole, wie die Verf. sich ausdrücken, sondern vielmehr ist es der äußere Teil des Kernes selbst (Kernsaftzone), während der kleine kompakte Körper dem Caryosom der anderen Protozoen entspricht.) Die Teilungsart soll eine Amitose sein, der kleinere Kern (Blepharoplast) teilt sich zuerst.

Eine Anzahl Abbildungen erläutern die Erklärungen der Autoren.

Rosenbusch.

Salvin Moore, J. E. Breinl, A. and **Hindle, E.** (1908). — The Life History of *Trypanosoma lewisi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology Vol. II No. 3.

Moore, Breinl und Hindle beschreiben die Bildung der multinuclearen Formen, die cytologische Struktur der verschiedenen Übergangsformen und die angebliche Parthenogenese, die in ähnlicher Weise stattfinden soll wie der von M. und B. schon in einer anderen Arbeit beschriebene Vorgang bei *Trypanosoma gambiense*, *equiperdum* und *equinum* (s. Ref. in Bd. XII Heft 1 u. 2).

Die mittelgroßen Trypanosomen wachsen zu großen Formen an, dabei geschehen zwei Metamorphosen, eine, indem das Intranuclear centrosom (Caryosom) sowie der äußere Teil des Kernes einen Teil abspaltet, der sich nach dem Vorderende der Zelle begibt, dort degeneriert und verschwindet. Sodann werden Massen aus dem Extranuclear centrosom (Blepharoplast) abgespalten, die sich unter der Vacuole, die bei dem Extra nuclear centrosom liegt, zu einem zweiten Kern sammeln, der nach dem Nucleus hin rückt und längere Zeit in seiner Nähe bleibt. S. M., B. u. H. nehmen an, daß nähere Beziehungen zwischen diesen Extranuclear centrosom adventive und dem Nucleus zustande kommen, die sie als Autogamie deuten. (Abgesehen davon, daß derartige Beziehungen nicht erwiesen sind, können sie auf keinen Fall als Autogamie gedeutet werden. Vgl. Ref. in Bd. XII Heft 1 u. 2.) Nach dem angenommenen Befruchtungsvorgang kommt es zur Teilung der Kerne, die direkt oder nach vorangegangener Zweiteilung zur Bildung von multinucleären Formen führt. Die Autoren meinen, daß diese Zweiteilungsbilder Anlaß zu falscher Auslegung geben konnten, und vergleichen sie mit den von Prowazek als Copulatien abgebildeten Formen. Doch Ref. glaubt, daß zwischen den Bildern von M., B, H. und denen von Prowazek keine derartige Ähnlichkeit besteht, die eine solche Verwechselung möglich machen könnte; denn das wesentliche bei der von Prowazek angenommenen Copulation sind die Kernverhältnisse, und wenn auch die Untersuchung nicht mit einer guten Färbung gemacht wurde, so läßt sich doch erkennen, daß die Kernstruktur der miteinander verbundenen Trypanosomen sehr verschieden ist. Die multinucleären länglichen Formen spalten sich und bilden Rosetten von kleinen Trypanosomen — dieses Stadium vergleichen M., B. u. H. mit den von ihnen beschriebenen latenten Körpern der anderen Trypanosomen.

Sie wachsen heran und nehmen nach Bildung der mittelgroßen Formen die gleiche Entwicklung, wie es schon referiert wurde.

Die Teilung des Hauptkernes wird, wie in einer anderen Arbeit von M. u. B. näher beschrieben, als Amitose betrachtet.

Bei der Teilung des Extranuclear centrosom (Blepharoplast) beschreiben die Autoren die Anordnung von Stäbchen zu einer Scheibe, die sich weniger intensiv färbt als das ruhende Extranuclear centrosom; danach sammelt sich das färbbare Material an entgegengesetzten Seiten der Scheibe und bildet dann von neuem die zwei stäbchenförmigen Extra nuclear centrosoms. (Nach unseren Untersuchungen ist die Teilung des Blepharoplasten eine vollkommene Mitose mit Spindel und Chromosomen.)

Die Geißel hat an ihrer Wurzel ein Knötchen, das aus dem Blepharoplast entsteht (Basalkorn).

Der Arbeit sind eine Anzahl schöner Abbildungen beigegeben.

F. Rosenbusch.

Berichtigung

zum Referat über die Arbeit von **S. Moore** u. **A. Breinl** in Bd. XII Heft 1 u. 2 dieser Zeitschrift.

Die angegebene Modifizierung der Heidenhain'schen Eisenhämatoxylinmethode ist von mir irrtümlicherweise Moore zugeschrieben. Das Verdienst, diese Färbung für Trypanosomen ausgearbeitet zu haben, gebührt Breinl.

Rosenbusch.

Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdr.), Naumburg a/S.



W. S. Patton gez.

6

7

8

13

12

14

15

16

21

22

23

24

25

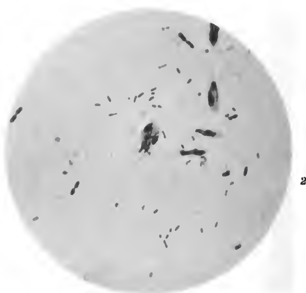


Fischer

Lith. Anst. v. Johannes Arndt, Jena



1



2

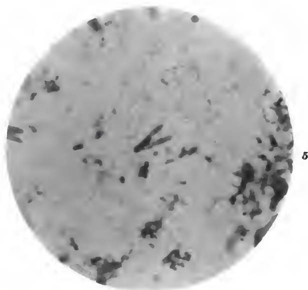
Verlag von Gustav Fischer in Jena.



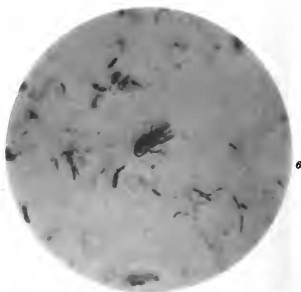
3



4

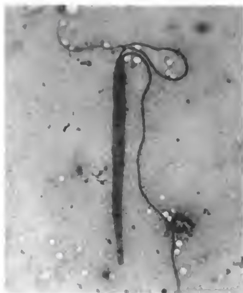


5

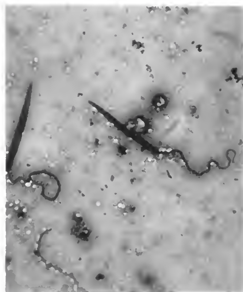


6

'ag von Gustav Fischer in Jena.

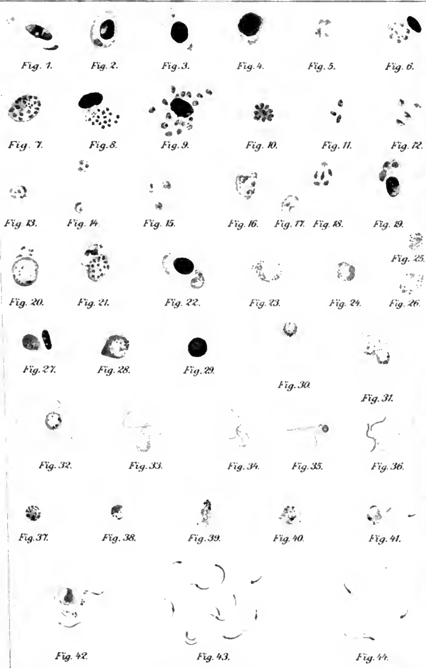


7



8

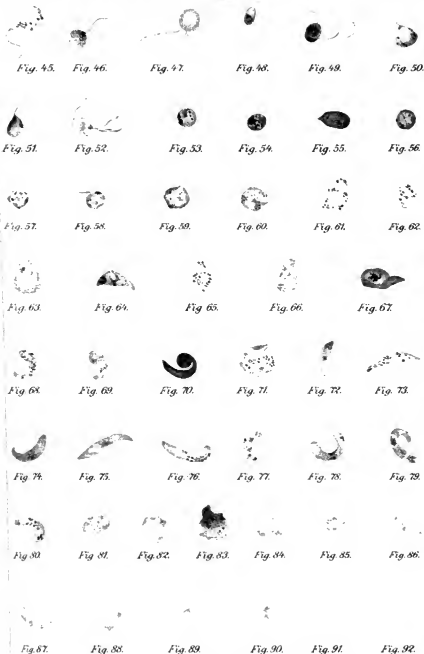
Reproduktion von J. B. Obernetter, Münc



Neumann gez.

Verlag v. Gustav Fischer, Jena

Lith.Anst.v.K.Wesser, Jena



Neumann gez.

Verlag v. Gustav Fischer, Jena

Lith. Anst. v. K. Wesser, Jena



Fig. 93.

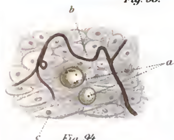


Fig. 94.

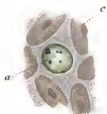


Fig. 95.



Fig. 96.



Fig. 97.



Fig. 98.

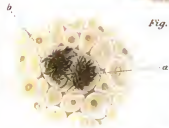


Fig. 99.

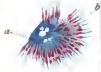


Fig. 102.


Fig. 100.

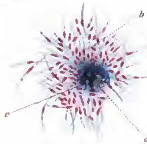
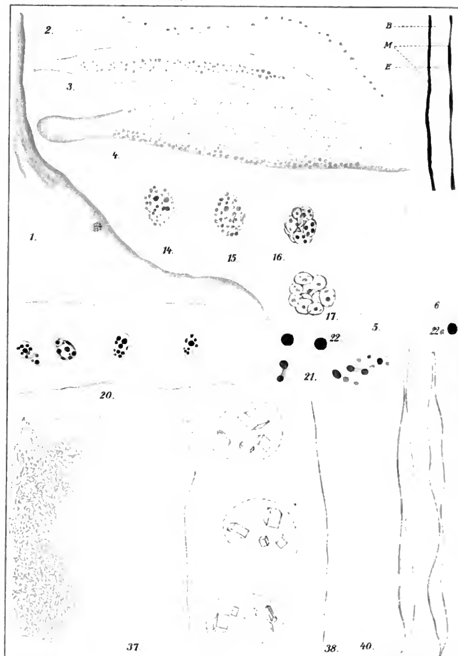


Fig. 101.

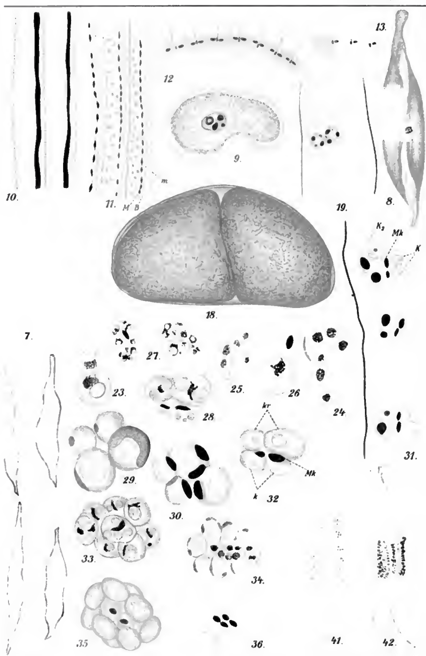

Fig. 103.

Neumann gez. Verlag v. Gustav Fischer, Jena Lith. Anst. v. K. Wesser, Jena



Lebedeff gez.

Verlag von Gustav


10.
11.
M
B
m
12
9.
13.
8.
19.
18.
K_1
Mk
K
7.
27.
23.
28.
25.
26
24.
kr
29.
30.
32
Mk
k
31.
33.
34.
35
36.
41.
42.

1.



a.



b.



4. 5. 6. 7. 8. 9. 10.










15. 16. 17. 18. 19. 20.

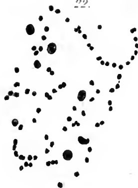









22.



23. 24. 25. 26.






27. 28. 29. 30.













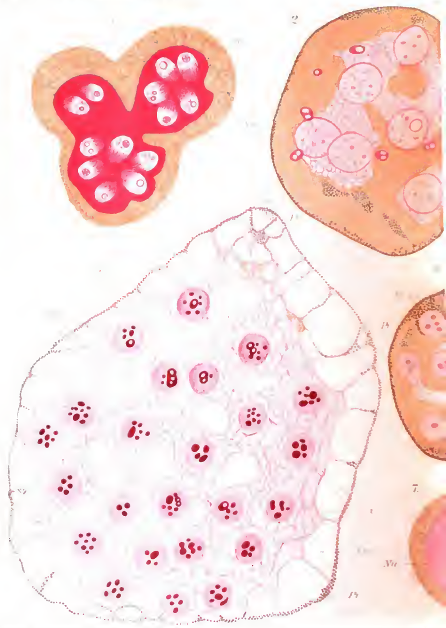






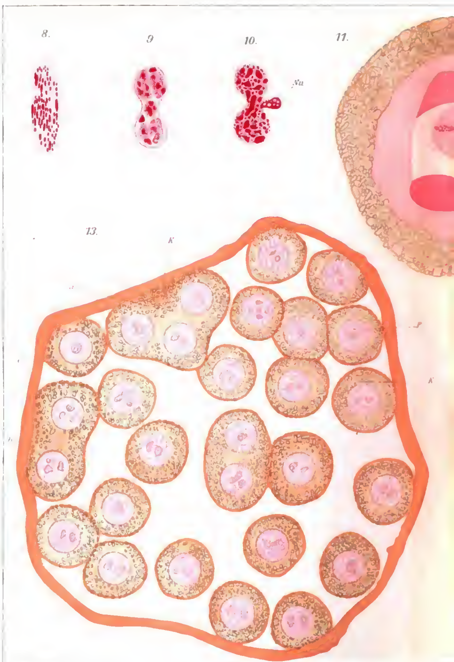




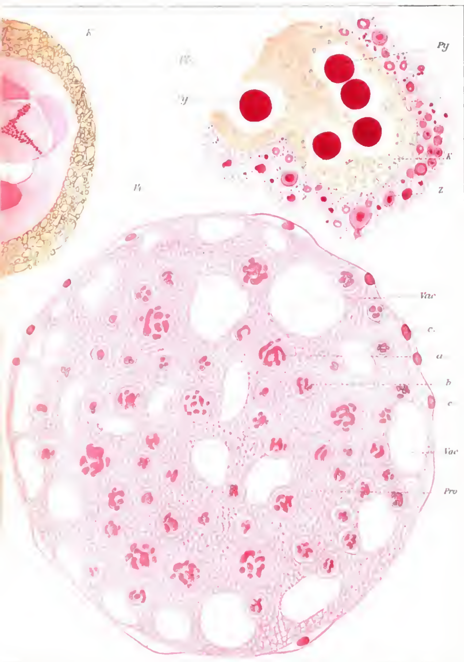




Lav Fischer,



Verlag v Gust



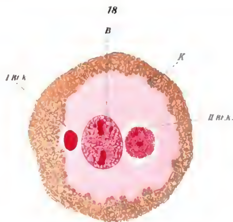
av Fischer, Jena

Lith.Anst.v.E.A.Funke Leipzig



Gustav

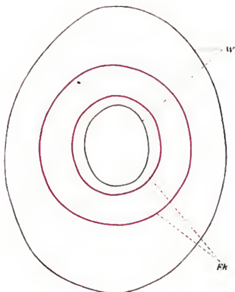
18



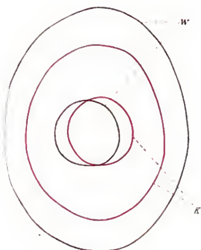
19

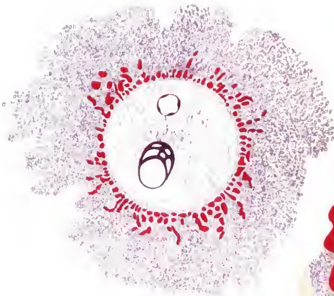


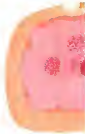
20

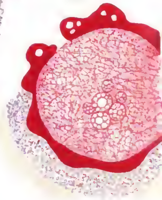


21

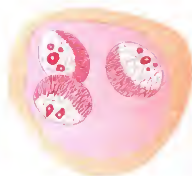








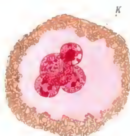


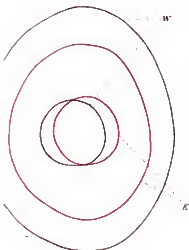


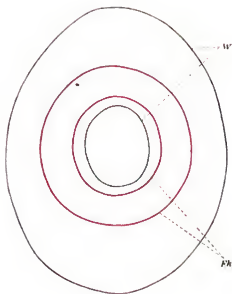



15
K
Pz
a
a
K
a
16
K
17
K
B

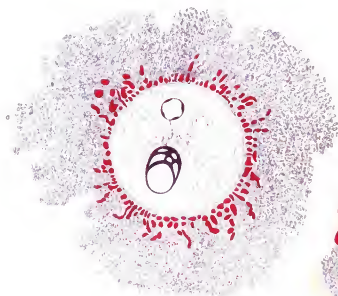




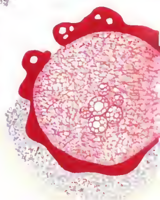




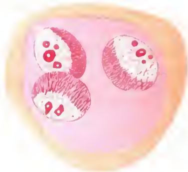
Fischer,





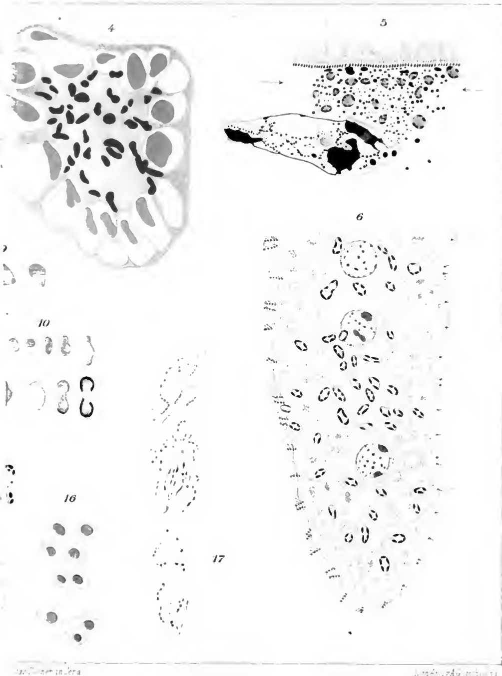









1
2
3
7
8
11
12
13
14
15


4
5
6
10
16
17

18

19

21



20

24



29



28



22



23



25



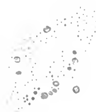
26



27



30



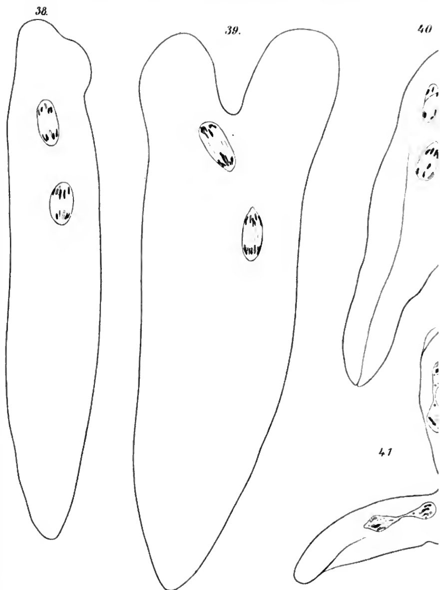
31

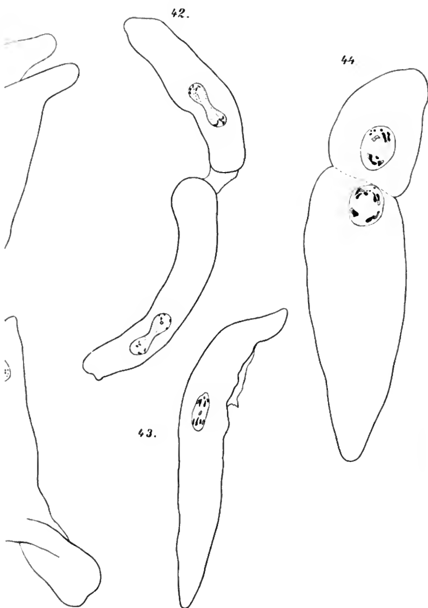


31a






38.
39.
40
41



Fischer in Jena.

45



46



49



47







55



56

48



57



50



53



54



51







52



58



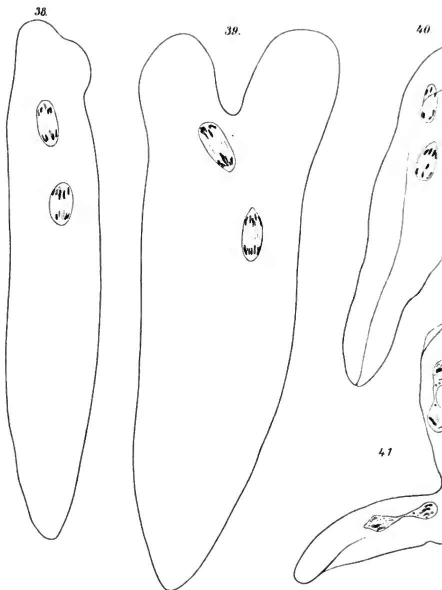
59





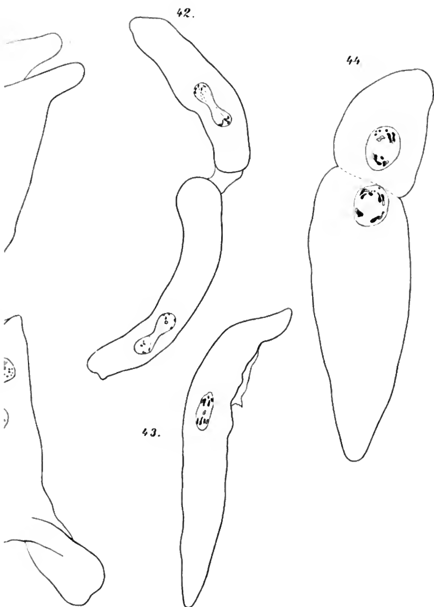


Verlag von Gu



Metcalf.

Verlag von Gustav



… Fischer in Jena.

45



46



49



47







55



56



48



57



50



55

54





51





52



58



59





60

61



62



63

64













70

68



69









65



66

67



74



72



73



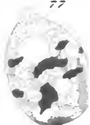


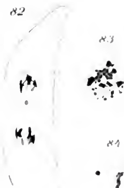





75


76


77


82
83
84


87


88


89



78



79



80



81



85



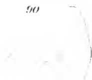
86



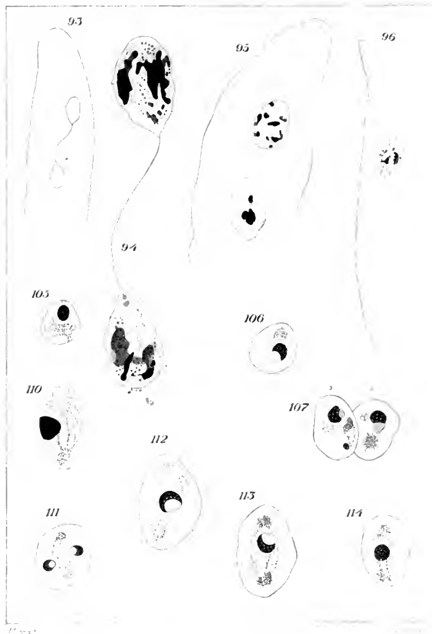
92

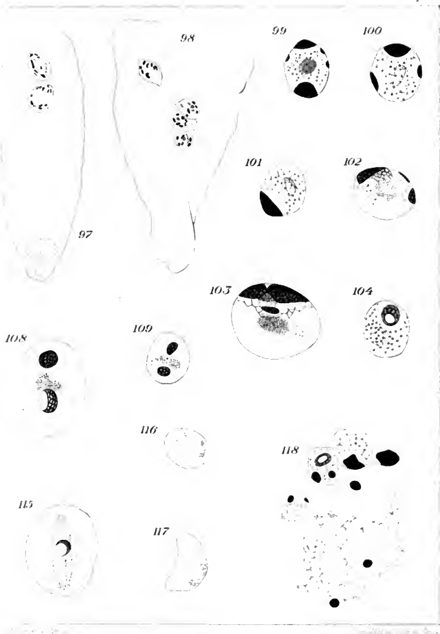


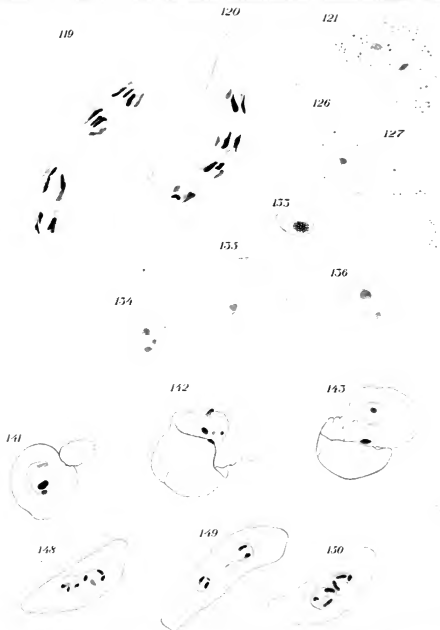
91



90


93
94
95
96
105
106
107
110
111
112
113
114


98
99
100
101
102
97
103
104
108
109
116
118
115
117



119
120
121
126
127
133
135
136
134
142
143
141
148
149
150

122 123 124 125

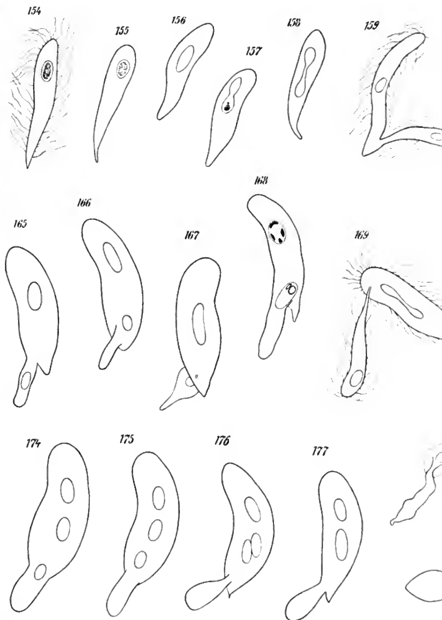
128 129 130 131 132

7 138 139 140

144 145 146 147

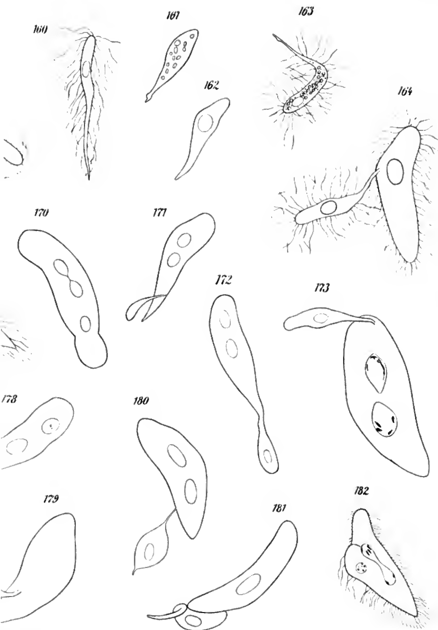
152 153

151

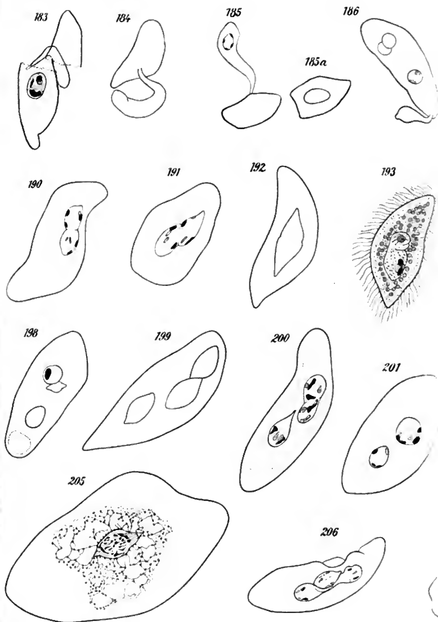


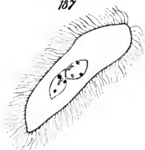
Metcalf.

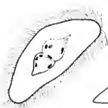
Verlag von Gust.

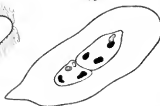


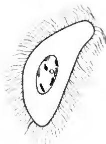
Fischer in Jena.


183
184
185
185a
186
190
191
192
193
198
199
200
201
205
206


187

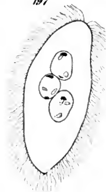

188

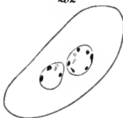

189

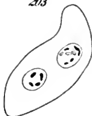

194


195

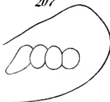

196


197

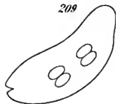

202


203

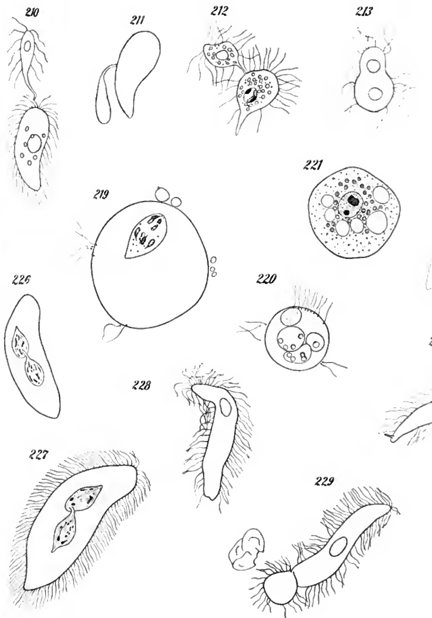

204


207


208

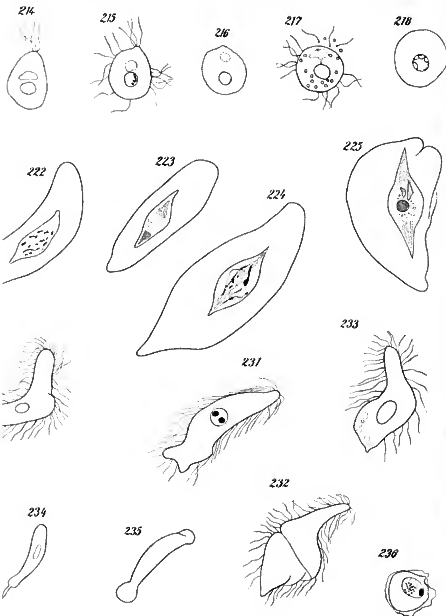

209

ischer in Jena.

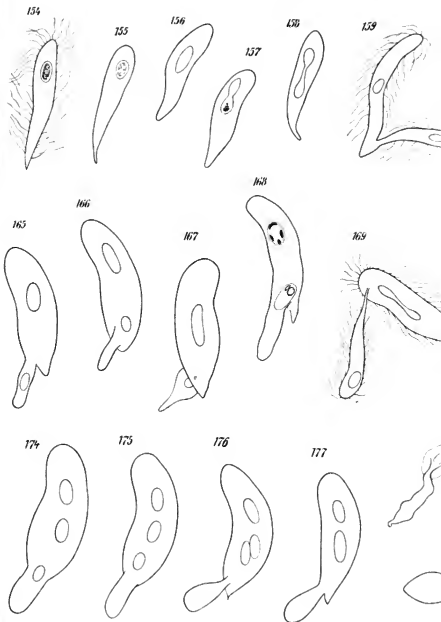


Metcalf.

Verlag von Gust

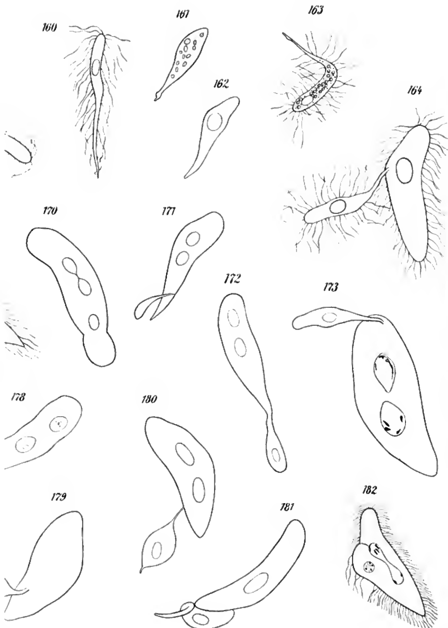


v Fischer in Jena.

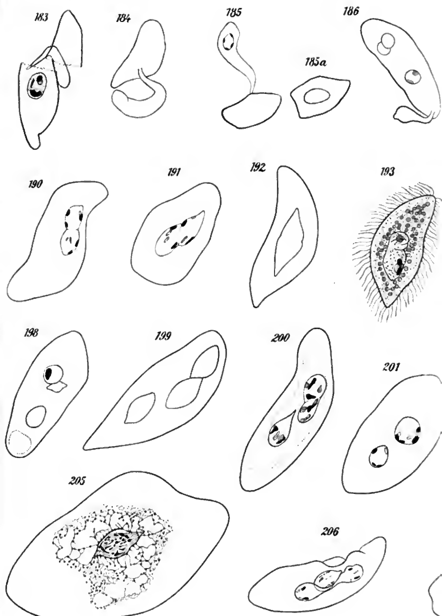


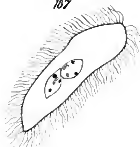
Metcalf.

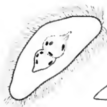
Verlag von Gust.



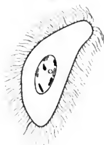
Fischer in Jena.


183
184
185
185a
186
190
191
192
193
198
199
200
201
205
206



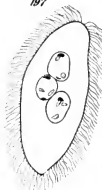


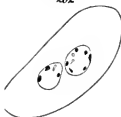


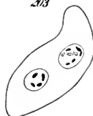


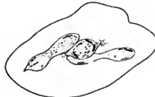


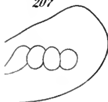




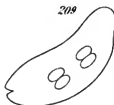




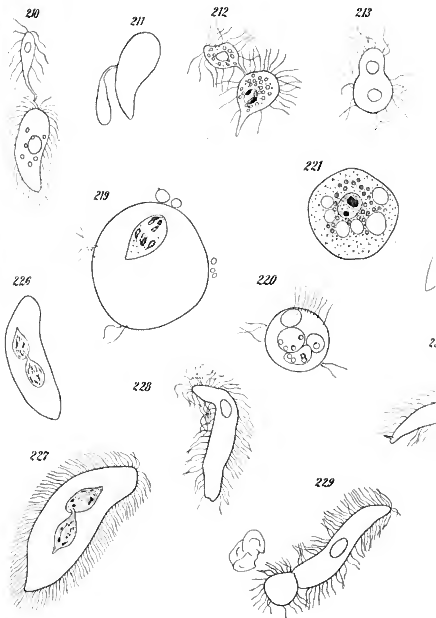


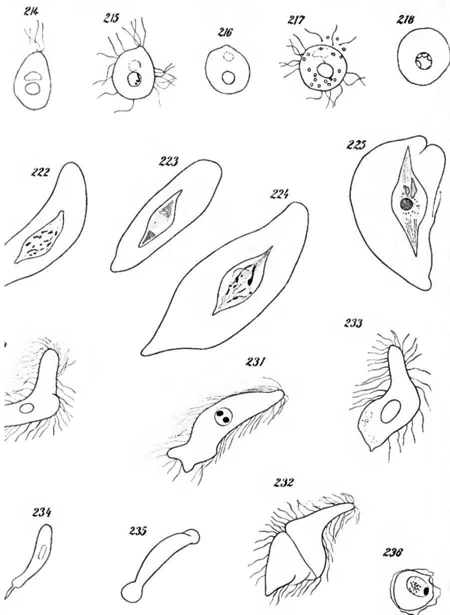




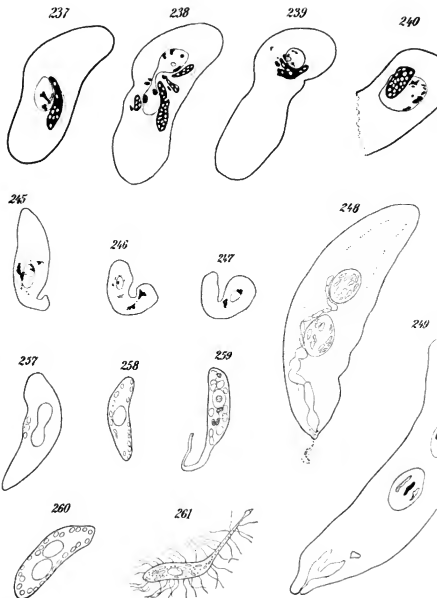


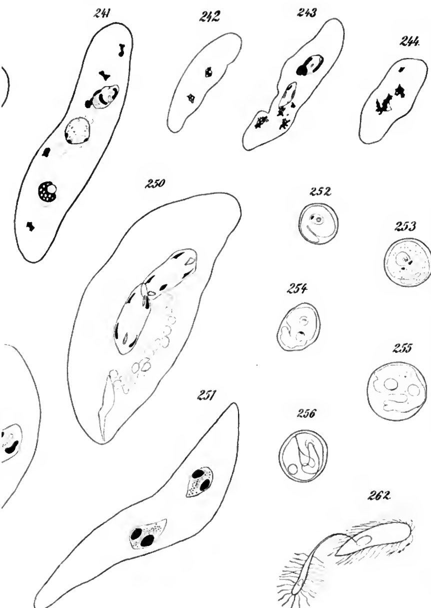
ɩcher in Jena.

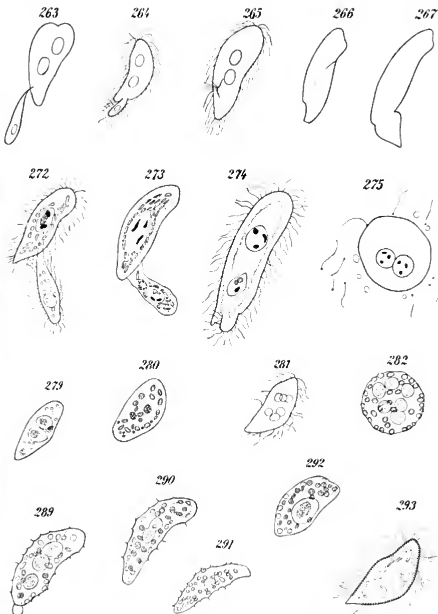

210
211
212
213
221
219
226
220
228
227
229



v Fischer in Jena.

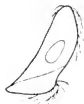

237
238
239
240
245
246
247
248
249
257
258
259
260
261

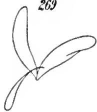

241
242
243
244
250
252
253
254
255
251
256
262



Metcalf.

Verlag von Gusta

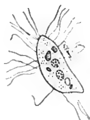

268


269


270


271


276


277


278


283


285


286


287


284


296


288

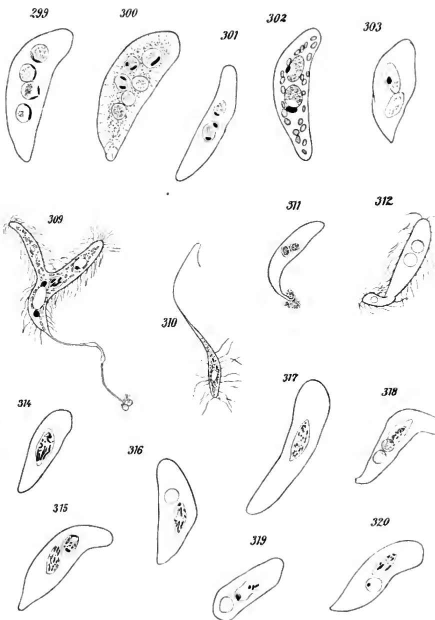

294


295


297

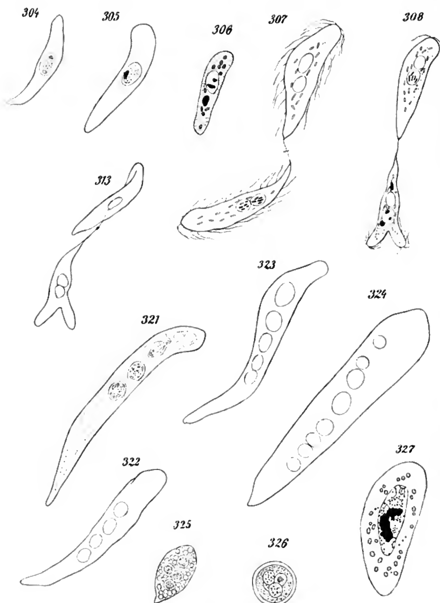

298

Fischer in Jena.

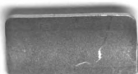


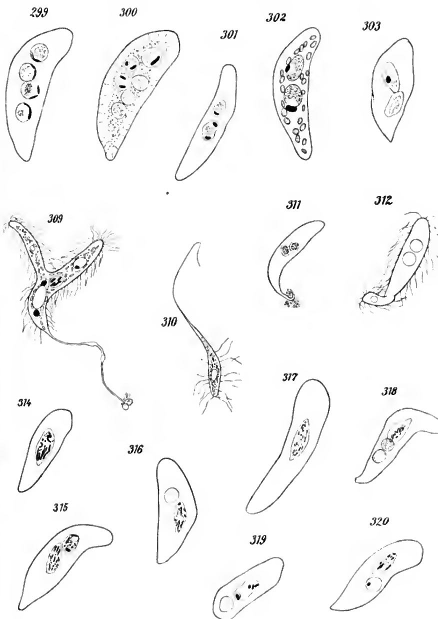
Metcalf.

Verlag von Gust



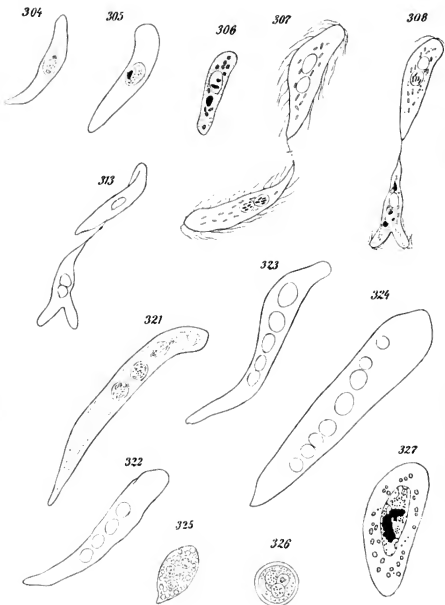
Fischer in Jena.



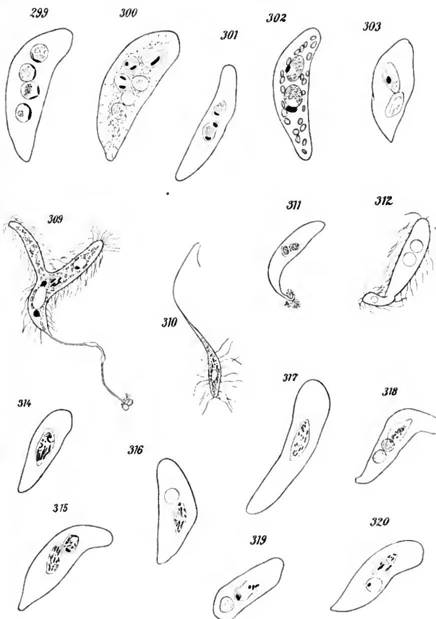


Metcalf.

Verlag von Gust.

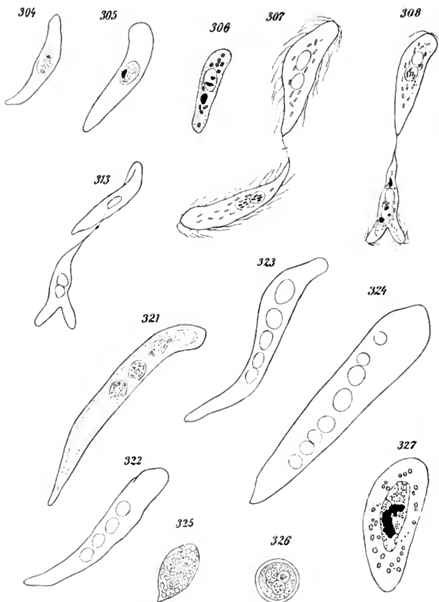


…v Fischer in Jena.



Metcalf.

Verlag von Gust.



v Fischer in Jena.

image
not
available